

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. Jonat)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

**REVERSION DES MALIGNEN PHÄNOTYPS BEIM
MAMMAKARZINOM DURCH STROMAFAKTOREN**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANNA-MARIA RÖMER
aus Detmold

Kiel, 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Arnold

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Kalthoff

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2014

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 24.09.2014

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	III
II. Tabellenverzeichnis	III
III. Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	1
1.2 Aufbau und Entwicklung der Brustdrüse	1
1.3 Das Mammastroma	3
1.4 Zellkulturmodelle in der Mammakarzinomforschung	4
1.5 Phänotypische Reversion von Mammakarzinomzellen	6
1.6 Ziel der Arbeit	6
2. Material und Methoden	8
2.1 Material.....	8
2.1.1 Geräte, Software.....	8
2.1.2 Verbrauchsmaterial, Substanzen, Kits, Antikörper	9
2.1.3 Medium.....	12
2.1.4 Zellen.....	13
2.2. Methoden	14
2.2.1 Medium und Lösungen	14
2.2.2 Zellkulturexperimente.....	16
2.2.3. Auswertung der dreidimensionalen Zellkulturen.....	20
2.2.4 Genexpressionsanalysen.....	22
3. Ergebnisse.....	25
3.1 Charakteristika der Patientinnenproben	25
3.2 Morphologische Analyse der dreidimensionalen Zellkulturen.....	26
3.3 Quantitative Analyse der dreidimensionalen Zellkulturen	29
3.4 Molekulare Signatur der revertierten und nicht-revertierten Tumorproben	31
3.4.1 Gene mit hochregulierter Expression in den revertierten Tumoren.....	31
3.4.2 Gene mit herunterregulierter Expression in den revertierten Tumoren	32
3.5 Validierung der Genexpressionsdaten	34
4. Diskussion	36
4.1 Wahl des Zellkulturmodells	36
4.2 Herausforderungen in der Kultivierung der PBC	37
4.3 Reversion des malignen Phänotyps.....	39
4.4 Interindividuelle Unterschiede in der Revertierbarkeit von PBC	41
4.5 Bedeutung der Fibroblasten im Reversionsprozess.....	42

4.5.1 Einfluss der von Fibroblasten sezernierten löslichen Faktoren.....	42
4.5.2 Einfluss der Fibroblasten auf die Matrixcompliance	43
4.6 Molekulargenetische Ursachen für die Reversion des malignen Phänotyps	45
4.7 Bewertung und Ausblick	48
5. Zusammenfassung.....	49
6. Literaturverzeichnis	51
7. Anhang.....	60
7.1 Zusage Ethikkommission.....	60
7.2 Aufklärungsformular.....	61
7.3 Isolierungen.....	63
7.4 Auswertung der Mono- und Cokulturen	66
7.5 qRT-PCR-Daten	79
Danksagung.....	80
Lebenslauf	81

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Anatomie der Brustdrüse	2
Abbildung 2. Schematische Darstellung einiger Kulturmodelle	5
Abbildung 3. Schematische Darstellung der dreidimensionalen Zellkulturen	18
Abbildung 4. Qualitative Analyse des Wachstums der PBC in Mono- und Cokultur	27
Abbildung 5. Morphologie der PBC in Mono- und revertierter Cokultur	28
Abbildung 6. Quantitative Analyse des Wachstums der PBC in Mono- und Cokultur	30
Abbildung 7. Validierung der mRNA-Level differentiell regulierter Gene durch qRT-PCR	35
Abbildung 8. Wachstum der PBC in Kulturflaschen	38
Abbildung 9. Lumenformierung durch Polarisierung und Apoptose am Beispiel der humanen Brustzelllinie MCF-10A	40

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Geräte	8
Tabelle 2. Software	9
Tabelle 3. Verbrauchsmaterial	9
Tabelle 4. Substanzen	10
Tabelle 5. Kits	11
Tabelle 6. Primärantikörper	12
Tabelle 7. Sekundärantikörper	12
Tabelle 8. Mediumzusätze	12
Tabelle 9. Stammlösungen	14
Tabelle 10. Arbeitslösungen	14
Tabelle 11. H14-Medium Zusätze	15
Tabelle 12. weitere selbst hergestellte Lösungen	16
Tabelle 13. Beispielrechnung einer Kollagen-Lösung	19
Tabelle 14. Berechnung der Zellsuspension	19
Tabelle 15. qRT-PCR Protokoll	23
Tabelle 16. Histopathologische und klinische Charakteristika der untersuchten Patientinnenproben	26
Tabelle 17. RNA-Qualität für die Hybridisierung auf dem Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)	31
Tabelle 18. Transkripte mit hochregulierter Expression in den revertierten Brustkrebsproben	31

Tabelle 19. Transkripte mit herunterregulierter Expression in den revertierten Brustkrebsproben	33
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

III. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -smooth muscle actin
aaUTP	Biotin
aRNA	Aminoallyl-RNA
CAF	cancer associated fibroblasts (tumorassoziierte Fibroblasten)
cT	cycle threshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DME/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELF5	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetal calf serum
GFP	green fluorescent protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HMF	human mammary fibroblasts
hTERT	humane Telomerase
LINGO1	leucine rich repeat and Ig domain containing 1
IrECM	Laminin angereicherten Matrix
MUCL1	mucin-like 1
NF	normal fibroblasts (normale Fibroblasten)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBC	primary breast cancer cells
PBS	Phosphate buffered saline
PIP	Prolactin-induced protein
P/S	Penicillin/ Streptomycin
SQLE	squalene epoxidase
STOP	stable tubule-only polypeptide
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZMYND11	zinc finger, MYND domain containing 11
ZO-1	Zonula occludens protein-1

1. Einleitung

Ende des 19. Jahrhunderts stellte Paget seine *seed and soil*-Theorie über die Entstehung von Fernmetastasen beim Mammakarzinom auf. Diese besagt, dass Tumorzellen (*seed*), die sich über das Gefäßsystem verteilen, nur dorthin metastasieren können, wo sie besonders günstige Bedingungen (*soil*) vorfinden (Paget, 1989). Das die Tumorzellen aufnehmende Gewebe, das Stroma, muss also die Ansiedelung und das Wachstum derselben aktiv fördern. Im Laufe der Zeit geriet diese Hypothese in Vergessenheit und wurde scheinbar durch die Entdeckung von Tumoviren, Onkogenen und Tumorsuppressorgenen widerlegt. Fortan standen zelleigene Signaltransduktionswege bzw. genetische Aberrationen der Krebszelle selbst im Zentrum der Aufmerksamkeit.

Neuere Forschungsergebnisse haben aber eindeutig gezeigt, dass tatsächlich wechselseitige Interaktionen zwischen den Tumorzellen und dem umgebenen Stroma stattfinden, und dass diese das Wachstum, die Progression, aber auch die Differenzierung der Tumorzellen beeinflussen (Bissell und Hines, 2011; Matrisian et al., 2001).

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist in Deutschland mit 72.400 Neuerkrankungen jährlich die weitaus häufigste Krebserkrankung bei Frauen (Krebsregisterdaten, 2012). Jede achte bis zehnte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (Bertz, 2010). Darüber hinaus ist bei Diagnosestellung etwa jede vierte Patientin jünger als 55 Jahre, jede zehnte sogar jünger als 45 Jahre (Krebsregisterdaten, 2012). Mit 71.660 Neuerkrankungen in 2008 erkrankten etwa doppelt so viele Frauen wie 1980 (Krebsregisterdaten, 2012). Die Inzidenz ist immer noch steigend (Bertz, 2010) auch wenn dies im Zusammenhang mit verbesserten Früherkennungsmaßnahmen beim Mammakarzinom steht. Für 2012 prognostiziert das deutsche Krebsregister am Robert-Koch-Institut 74.500 Neuerkrankungen (Krebsregisterdaten, 2012). Die Therapie des Mammakarzinoms ist vielfältig, wenngleich die Mortalität mittels operativer, endokriner, Chemo- und Radiotherapie sowie zielgerichteter, sogenannter *targeted therapies*, nicht gesenkt werden konnte (Kreienberg et al., 2008). Das Mammakarzinom war mit 17066 Todesfällen im Jahre 2009 noch immer die häufigste krebssbedingte Todesursache bei Frauen in Deutschland (Bertz, 2010; Deutschland, 2011). Somit bleibt die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien eine wichtige Anforderung an die onkologische Forschung.

1.2 Aufbau und Entwicklung der Brustdrüse

Im Gegensatz zu vielen anderen Organen des menschlichen Körpers erfolgt ein Großteil der Entwicklung der Brustdrüse postnatal (Bissell et al., 2003). Erst unter dem Einfluss von Hormonen während der Pubertät beginnen die primitiven Milchgänge zu proliferieren und bilden die typische Drüsenarchitektur aus (Böcker et al., 2008). Beginnend mit dem weiblichen Zyk-

lus bis hin zu Schwangerschaft und Menopause unterliegt das Epithel der Brustdrüse hormonbedingten Veränderungen und somit einem ständigen Wechsel zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Nur während Schwangerschaft und Stillzeit ist das Mammapithel voll entwickelt und übt seine eigentliche Funktion, die Milchproduktion aus (Böcker et al., 2008). Die Brustdrüse setzt sich aus 10-20 Einzeldrüsen (Lobi) zusammen, deren Endstücke (Azini) gruppiert angeordnet (Lobuli) sind (Abbildung 1). Jeder Lobulus wird von einem Terminalduktus drainiert, mehrere dieser Terminalduktus bilden zusammen den Ductus lactifer, welcher in den Ductus lactifer colligens mündet und somit die Brustwarze erreicht (Lüllmann-Rauch, 2006).

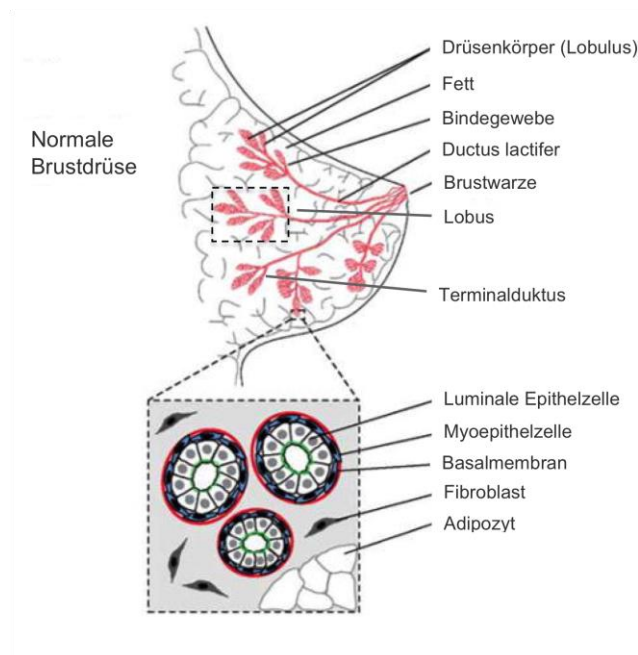


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Anatomie der Brustdrüse

Modifiziert nach Nelson et al., 2005 (Nelson und Bissell, 2005). Kasten: Vergrößerung eines Drüsenkörpers mit drei zweischichtig aufgebauten Drüsenazini, umgeben von lockerem, zellreichem Bindegewebe.

Die kleinste histologische Einheit dieser tubuloalveolären Drüse ist das Drüsenläppchen bzw. der Azinus (Lüllmann-Rauch, 2006). Er zeigt einen zweischichtigen Aufbau, bestehend aus einer luminalen Epithelzellschicht und einer äußeren basalen Schicht aus Myoepithelzellen, die die luminalen Zellen umschließen (Abbildung 1) (Lüllmann-Rauch, 2006; Nelson und Bissell, 2005). Die luminalen Epithelzellen stehen nicht in direktem Kontakt mit einer Basalmembran, sondern sind mit den Myoepithelzellen verbunden (Adriance et al., 2005). Diese beeinflussen maßgeblich das Wachstum und die korrekte Ausbildung einer baso-apicalen, also polaren Ausrichtung (Polarität) der luminalen Epithelzellen (Adriance et al., 2005). Die Myoepithelzellen produzieren zusätzlich Bestandteile der Basalmembran, wie z.B. das Laminin-111 (Bissell und Bilder, 2003). Die Basalmembran grenzt den Azinus vom umgebenden Stroma ab (Polyak und Kalluri, 2010). Experimente mit luminalen Epithelzellen, die unter Zusatz von lactogenen Hormonen in einer mit Laminin angereicherten Matrix (IrECM) kulti-

viert wurden, beweisen eine Abhängigkeit der Differenzierung der Epithelzellen von Myoepithelzellen, die eine korrekte Basalmembran produzieren. Durch die IrECM bilden sie auch in Abwesenheit von Myoepithelzellen eine korrekte baso-apicale Polarität aus und zeigen an ihrer Oberfläche als Differenzierungsmarker die Expression von Milchproteinen (β -Casein) (Li et al., 1987). Werden die gleichen Epithelzellen in einer Matrix kultiviert, die nur aus Kollagen besteht, differenzieren sie nicht und zeigen dadurch auch keine Expression von β -Casein. Erst die Cokultivierung mit Myoepithelzellen, die ihrerseits Laminin-111 produzieren, ist in der Lage, eine Polarisierung der Epithelzellen in einer zusatzfreien Kollagen-Matrix zu induzieren (Gudjonsson et al., 2002).

1.3 Das Mammastroma

Ca. 80 % des gesamten Brustvolumens wird durch das Bruststroma gebildet. Jeder Azinus und sein drainierender Gang (die sog. Terminalduktus-Lobulus-Einheit) sind von diesem Bindegewebe umgeben (Abbildung 1). Zusammen mit Adipozyten, Prä-Adipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, lymphatischen Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM) stellt dieses das Stroma dar (Watson und Khaled, 2008). Das Stroma spielt in der Entwicklung der Brustdrüse eine bedeutende Rolle, da die Architektur der Epithelzelle durch Interaktionen mit mesenchymalem Gewebe bestimmt wird (Arendt et al., 2010). Für die dauerhafte Ausbildung einer korrekten Polarität des Mammaepithels ist ein komplexes Zusammenspiel aus Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten verantwortlich (Bissell und Bilder, 2003; Xu et al., 2009). Die reziproke Kommunikation zwischen Stroma und Epithel beeinflusst nicht nur die Differenzierung der Epithelzellen, sondern auch ihr Proliferations- und Migrationsverhalten (Nelson und Bissell, 2006).

Es ist bekannt, dass sich während der Brustkrebsentstehung Veränderungen im umgebenen Stroma ereignen (Hanahan und Weinberg, 2011). Es ist zwar die Epithelzelle, die anfängt, sich scheinbar unkontrolliert zu teilen, die Basalmembran durchbricht und das umliegende Stroma infiltriert; aber genau dieses Stroma stellt im Rahmen der Tumorenstehung mehr dar als nur einen "*innocent bystander*" (Erickson und Barcellos-Hoff, 2003). Es nimmt seinerseits aktiv an der Kontrolle des Tumorwachstums, der –progression und an der Hemmung des Tumorwachstums teil (Bissell und Radisky, 2001; Kalluri und Zeisberg, 2006; Wiseman und Werb, 2002). Es entsteht ein so genanntes *tumormicroenvironment*.

Das *tumormicroenvironment* ist u.a. charakterisiert durch eine Vermehrung von Immunzellen, der Kapillardichte und von Fibroblasten, die vermehrt glattes Muskelaktin (α -smooth muscle actin [α -SMA]) produzieren und als sogenannte *cancer associated fibroblasts* (CAF) (Kalluri und Zeisberg, 2006; Ronnov-Jessen et al., 1996) bezeichnet werden. Es wird fibrotisch umgebaut, was mikroskopisch als desmoplastische Stromareaktion bezeichnet wird (Ronnov-Jessen et al., 1996). Neben den beschriebenen morphologischen Veränderungen

im Stroma können eine Reihe funktioneller Veränderungen nachgewiesen werden. Das *tumormicroenvironment* bietet den Tumorzellen Schutz gegen das menschliche Immunsystem (Bissell und Radisky, 2001). Außerdem konnten mittels methylierungsspezifischer digitaler Karyotypisierung auch ausgeprägte epigenetische Alterationen in den Stromazellen von Brustkrebspatientinnen festgestellt werden (Hu et al., 2005). Darüber hinaus wurden Änderungen des Genexpressionprofils in den Fibroblasten in Abhängigkeit von der Tumorphase beschrieben (Allinen et al., 2004). Der Einfluss der CAF auf den Phänotyp und das Wachstumsverhalten einer Zelle wurde eindrucksvoll bewiesen durch die Erkenntnis, dass CAF nicht nur in der Lage sind, das Wachstum von Prostata-Karzinomzellen zu stimulieren, sondern sogar benigne Prostata-Epithelzellen maligne zu transformieren (Olumi et al., 1999). Übereinstimmend dazu konnten Shekhar et al. unter Verwendung eines dreidimensionalen Zellkulturmodells zeigen, dass im Gegensatz zu Fibroblasten aus gesundem Mammagewebe (normale Mamma-Stromafibroblasten, NF) CAF das Wachstum von normalen und präneoplastischen Mammaepithelzellen induzieren (Shekhar et al., 2001). NF haben nicht nur negative Effekte auf das Wachstums- und Invasionsverhalten von Tumorzellen, sie sezernieren auch Proteasen-Inhibitoren und Matrix-Metalloproteasen und inhibieren so die von Tumorzellen induzierte Angiogenese (Hu et al., 2008). Cokultivierung der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 mit humanen normalen Hautfibroblasten führte zum Beispiel zu einer Abnahme der Proliferationsrate und einer Zunahme der Radiosensitivität der MCF7-Zellen (Rossi et al., 2000).

Somit spielt das Stroma insgesamt eine ambivalente Rolle in der Regulation des Tumorstwachstums, da es sowohl als Tumorpromotor (Bhowmick et al., 2004) (z.B. CAF), als auch als Tumorsuppressor (z.B. NF) agieren kann. Welche Rolle es letztendlich einnimmt, ist maßgeblich abhängig von der Epithelzelle an sich (Luhr et al., 2012; Su et al., 2012).

1.4 Zellkulturmodelle in der Mammarkarzinomforschung

Im Allgemeinen lassen sich in der Forschung mit Zellkulturmodellen zwei große Kulturmodellgruppen unterscheiden: Zwei- und dreidimensionale Zellkulturmodelle (Abbildung 2). In den zweidimensionalen Kulturmodellen wachsen die Zellen als einzelne Schicht auf einer Kulturplatte bzw. Kulturflasche (Abbildung 2A) und können - z.B. durch einen Sieb-Einsatz - voneinander getrennt durch sezernierte Stoffe der im Sieb wachsenden Zellen beeinflusst werden (Abbildung 2B). Die sezernierten Stoffe werden ins Medium abgegeben und erreichen so die Zellen am Boden.

In einer dreidimensionalen Zellkultur hingegen wachsen die Zellen in der jeweilig verwendeten Matrix (Lee et al., 2007). Ein einfaches Beispiel hierfür ist eine on-top-Kultur. Hier werden die Zellen auf eine noch flüssige, dreidimensionale Matrix pipettiert (Abbildung 2C). Gängiger ist es allerdings, die Zellen vorher in der entsprechenden Matrix (z.B. Matrigel™, Kollagen-I) zu resuspendieren und dann auf die Kulturplatte zu geben (Abbildung 2D).

In einer dreidimensionalen Cokultur wachsen die verschiedenen Zelltypen, im Vergleich zu den Kulturen mit Siebeinsatz, in direktem Kontakt zueinander. Je nach Fragestellung können z.B. reine Kollagen-Matrizes oder mit bestimmten Substanzen versetzte Matrizes verwendet werden. Ein bekanntes Beispiel für eine bereits mit biologisch aktiven Substanzen versetzte Matrix ist Matrigel™. Matrigel™ wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom gewonnen (BDBiosciences) und besteht u.a. aus den Hauptkomponenten Kollagen-IV (31%), Laminin (56%), Entactin (8%) und Heparansulfat-Proteoglykan (Kleinman et al., 1986; Kleinman et al., 1982; McGuire und Seeds, 1989; Vukicevic et al., 1992).

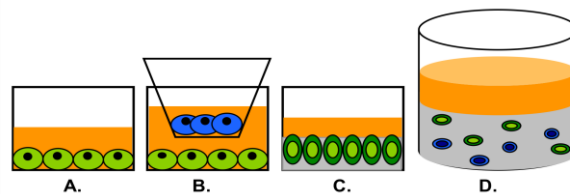


Abbildung 2. Schematische Darstellung einiger Kulturmodelle

Orange: Medium, Blau und Grün: Zellen, Grau: Matrizes

A. Zweidimensionale Kultur. Die Zellen wachsen als einzelne Schicht.

B. Zweidimensionale Kultur mit Sieb-Einsatz. Sezernierte Stoffe der blauen Zellen erreichen über das Medium die grünen Zellen.

C. Dreidimensionale *on-top*- Kultur. Eine beliebige Matrix wird auf den Boden der Kulturplatte vorgelegt und die Zellen sofort auf die noch flüssige dreidimensionale Matrix pipettiert.

D. Dreidimensionale Cokultur. Zwei verschiedene Zelltypen (Cokultur) wachsen in direktem Kontakt zueinander in einer sie allseits umgebenden Matrix.

Die zweidimensionalen Ansätze haben vor allem den Nachteil, dass die Zellen ihre Polarität und ihre Differenzierung verlieren (Yamada und Cukierman, 2007). Dadurch, dass sie als einzelne Schicht wachsen, verlieren sie funktionelle Eigenschaften, die sie in einem dreidimensionalen Kontext inne hatten (Yamada und Cukierman, 2007). Außerdem zeigen sie ein verändertes Genexpressionsmuster (Yamada und Cukierman, 2007).

Obwohl jedes voll entwickelte Organ um ein Vielfaches komplexer ist als die Bedingungen, die in Zellkulturmodellen geschaffen werden (Inman und Bissell, 2010), können Zellen in dreidimensionalen Kulturen unter möglichst in vivo nahen Verhältnissen kultiviert werden (Su et al., 2007). Hier kann durch gezielte Veränderung u.a. der Matrixdichte (Paszek et al., 2005), der Zusammensetzung des Mediums und der Matrixzusammensetzung (Plachot et al., 2009; Su et al., 2007), durch Cokultivierung verschiedener Zelltypen (Holliday et al., 2009; Wang, X. et al., 2010) die Architektur und Funktion sowohl der gesunden als auch der maligne transformierten Mamma nachgeahmt werden (Su et al., 2007; Yamada und Cukierman, 2007). So ist es möglich, den Einfluss ausgewählter Faktoren auf das Verhalten und die Wachstumseigenschaften maligner und benigner Zellen zu untersuchen.

1.5 Phänotypische Reversion von Mammakarzinomzellen

Aus der Literatur ist mittlerweile bekannt, dass der maligne Phänotyp einer Krebszelle kein dauerhafter Zustand ist. Durch Beeinflussung des *tumormicroenvironments* kann eine phänotypische Reversion, also ein Wiedererlangen einer benignen Zellarchitektur und – differenzierung, erreicht werden.

Beispielsweise kann der maligne Phänotyp von Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T4-2 in Matrigel™ durch Reduktion der Oberflächenaktivität von β 1-Integrin revertiert werden (Weaver, V. M. et al., 1997). Eine kombinierte Hemmung von β 1-Integrin und entweder der MAP-Kinase oder der PI3-Kinase induziert eine Reversion der invasiven humanen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MCF7 in Matrigel™ oder führt in Zellen der humanen Brustkrebszelllinie Hs578t zum Zelltod (Wang, F. et al., 2002).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Reversion epigenetische Veränderungen induzieren kann. Die DNA von T4-2-Zellen, die ein karzinomartiges Zellwachstum zeigen, ist resistenter gegenüber der Verdauung durch das Restriktionsenzym Alu-I als die DNA von T4-2-Zellen, die ihrerseits durch die Zugabe von PI3K-Inhibitoren und dibutyryl-cAMP polarisierte, azinus-ähnliche Zellcluster ausbilden. Die DNA dieser phänotypisch revertierten T4-2-Zellen ist ebenso sensibel für Alu-I wie die der humanen, nicht-malignen Mamma-Zelllinie MCF10A (Sandal et al., 2007).

1.6 Ziel der Arbeit

Das Stroma spielt eine entscheidende Rolle in der Differenzierung, Entwicklung und Regulation des Proliferations- und Migrationsverhalten des Mammaepithels (s. 1.2 und 1.3). Veränderung im Stroma bringen dieses empfindliche Gleichgewicht durcheinander; es bildet sich ein *tumormicroenvironment* und maligne transformierte Zellen können ungehindert proliferieren. In einer definierten Umgebung sind die reziproken Wechselwirkungen zwischen Epithel und Stroma aber dazu in der Lage, ein benignes Wachstum von Brustkrebszellen zu induzieren. Der Phänotyp einer malignen Zelle kann durch gezielte Hemmung von Signalwegen revertiert werden (s. 1.5).

In der Literatur beschrieben sind vornehmlich Experimente, in denen Brustkrebszelllinien und mit spezifischen Substanzen versetzte Matrices verwendet werden. Dies entspricht jedoch nicht den in vivo Verhältnissen in der Brustdrüse, denn auch wenn Zelllinien aus primären Zellen entstehen, haben sie z.B. aufgrund von genetischen Veränderungen, *epidermal growth factor* (EGF)-Depletion oder viraler Transfektion mit der ursprünglichen Zelle nur noch wenig gemein (Briand und Lykkesfeldt, 2001; Briand et al., 1996).

Um die Bedeutung stromaler Faktoren im Reversionsprozess zu untersuchen, befasst sich diese Arbeit mit der Frage, ob normale, humane Mammastromafibroblasten (*human mammary fibroblasts* (HMF)) in der Lage sind, den malignen Phänotyp von primären Brustkrebszellen (*primary breast cancer cells*, PBC) in einer dreidimensionalen Matrix aus Kol-

lagen-I zu revertieren. Die verwendeten PBC werden unmittelbar postoperativ aus dem Tumorgewebe gewonnen und anschließend durch Cokultivierung in einer dreidimensionalen Kollagen-I-Matrix mit HMF mit einem normalisierten, benignen Stroma konfrontiert, welches dem in der gesunden humanen Brustdrüse in vivo sehr ähnlich ist. Die Nutzung des dreidimensionalen Cokulturmodells und die Verwendung von drei definierten Parametern, PBC, HMF und Kollagen-I, begrenzt die Variabilität und schafft konstante Versuchsbedingungen. Zusätzlich soll eine Assoziation der Reversion eines Tumors mit seinen klinisch-pathologischen Charakteristika untersucht werden. Schließlich soll durch globale Genexpressionsanalysen eine molekulare Signatur von revertierbaren und nicht-revertierbaren Tumoren ermittelt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Software

Tabelle 1. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank, Forma Scientific CO2 Water Jacketed Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop Axioscope	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
GeneChip® Scanner 3000	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
Inkubator, Heidolph 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Invertiertes Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Kolbenhubpipetten (0,5-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Laserscanmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Pipettierhilfe, Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
rotierender Plattformschüttler, Heidolph Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
reziproker Plattformschüttler, Heidolph Promax 1020	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Sterilbank, NuAire Class II	NuAire Laboratory Equipment Supply, Minnesota, USA
Schüttelwasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Thermocycler, MJ Research PTC-200	GMI, Inc., Minnesota, USA
Tischthermostat, ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrospec™ 3100 pro UV/Visible Spectrophotometer	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Vortexer, Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge, Rotina 48RC	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2. Software

Bezeichnung	Hersteller
GeneChip® Operating Software (GCOS)	Affymetrix, Santa Clara, USA
NIH ImageJ 1.40g	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Zeiss AxioVision Software Rel.4.6.3	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial, Substanzen, Kits, Antikörper

Tabelle 3. Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Cryovials	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
falcon cell strainer 40 µm/100 µm	BD Biosciences, Two Oak Park, Bedford, USA
Gewebekulturplatten	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Objekträger	Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Objekträgersystem	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Rotilabo Probenfläschchen/Schraubkappen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter CA 0,2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Zellkulturflaschen T75/T25	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Zellkulturplatten Cellstar 6-, 12-, 24- und 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 4. Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Aqua dest. aus dem Millipore Elix 5	Millipore, Billerica, USA
Collagen I rat tail	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Collagenase Typ1	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche Phama AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DME/F12)	Hyclone (Perbio science) Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ELF5 QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
GeneChip® Expression 3' Amplification Reagents - Hybridization Controls sufficient for 30 reactions	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FCS (fetal calf serum)	Invitrogen, Californien, USA
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) 1×, liquid	Invitrogen, Californien, USA
Hyaluronidase	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
iQ™ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
LINGO1 QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN, Hilden, Deutschland
MAP6 QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN, Hilden, Deutschland
MUCL1 QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH+ Co.KG, Karlsruhe; Deutschland
NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd 16 %	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml /10.000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 4. Substanzen

Phosphate buffered saline (PBS) 1× ohne CaCl ₂ oder MgCl ₂	Gibco Invitrogen, Californien, USA Corporation, Grand Island, NY, USA
PIP2 QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Propidiumiodid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
RNase	QIAGEN, Hilden, Deutschland
SQLE1 QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Tissue Tek O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Deutschland GmbH, Staufen, Deutschland
Trypsin 0,25 %	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Triton-X	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin neutralizing solution	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vectashield	Axxora Deutschland GmbH, Lörrach, Deutschland
Ziegsenserum	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
ZMYND11 QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN, Hilden, Deutschland

Tabelle 5. Kits

Bezeichnung	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit sufficient for approx. 100 reactions	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit sufficient for 30 reactions	Affymetrix, Santa Clara, USA
In Situ Cell Death Detection Kit (POD)	Roche Pharma AG, Mannheim, Deutschland
MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Single Round aRNA Amplification Kit	Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
RNeasy® Micro Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QuantiTect® Reverse Transcription Set	QIAGEN, Hilden, Deutschland

Tabelle 6. Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
monoclonal mouse anti β 1-Integrin	Labvision/ Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	1:200
monoclonal mouse anti β 4-Integrin	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:50-1:200
polyclonal rabbit anti β -catenin	Labvision/ Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	1:25-1:50
monoclonal mouse anti cytokeratin	Medac GmbH, Wedel, Deutschland	1:100
polyclonal rabbit anti cytokeratin wide spectrum	abcam, Berlin, Deutschland	1:100
monoclonal mouse anti golgin-97	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland	1:100
polyclonal rabbit anti vimentin	Labvision/ Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	1:100
polyclonal rabbit anti zonula occludens protein-1 (ZO-1)	New England Biolabs GmbH, Ipswich Massachusetts, USA	1:25

Tabelle 7. Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor® 488 goat anti rabbit	Invitrogen, Californien, USA	1:500
Alexa Fluor® 555 goat anti rat	Invitrogen, Californien, USA	1:500
Alexa Fluor® 594 goat anti mouse	Invitrogen, Californien, USA	1:500

2.1.3 Medium

Es folgt die Auflistung der Medium-Zusätze. Die Beschreibung der korrekten Herstellung und Verwendung der Zusätze erfolgt unter 2.2.1.

Tabelle 8. Mediumzusätze

Bezeichnung	Hersteller
apo-Transferrin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
β -Estradiol	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EGF	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 8. Mediumzusätze

Hydrocortison	SIGMA-Aldrich Deutschland	Chemie	GmbH,	Steinheim,
Insulin (≥ 27 USP units per mg)	SIGMA-Aldrich Deutsch-land	Chemie	GmbH,	Steinheim,
Prolaktin	SIGMA-Aldrich Deutschland	Chemie	GmbH,	Steinheim,
Sodium selenite	SIGMA-Aldrich Deutschland	Chemie	GmbH,	Steinheim,

2.1.4 Zellen

- primäre Mammakarzinomzellen (*primary breast cancer cells*, (PBC)). Die PBC wurden aus primären Mammakarzinomen isoliert (s. 2.2.2.3)
- immortalisierte humane Mammastromafibroblasten (*human mammary fibroblasts* (HMF)). Die HMF wurden aus Mammarreduktionsplastiken gewonnen und durch retrovirale Transduktion mit humaner Telomerase (hTERT) immortalisiert (Kuperwasser et al., 2004) . Zusätzlich exprimieren die Zellen *green fluorescent protein* (GFP) als Transgen, welches ihre Identifizierung durch Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht (Kuperwasser et al., 2004).

2.2. Methoden

2.2.1 Medium und Lösungen

2.2.1.1 Herstellung der Stamm- und Arbeitslösungen

Tabelle 9. Stammlösungen

Substanz	Herstellung	Haltbarkeit
Insulin	20 mg Insulin wurden in 10 ml HCl (5 mM) gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert und bei -80 °C gelagert.	mehrere Jahre
Hydrocortison	50 mg Hydrocortison wurden in 10 ml Ethanol gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert und bei -80 °C gelagert.	1 Jahr
β-Estradiol	25 mg β-Estradiol wurden in 3,125 ml Ethanol gelöst (8 mg/ml). 0,1 ml dieser Lösung wurden mit 3 ml Ethanol verdünnt (1 mM). Um eine 10 µM Lösung zu erhalten, wurden 20 µl der 1 mM Lösung mit 1,98 ml Ethanol verdünnt. Die Lösungen wurden bei -20 °C vor Licht geschützt in braunen Probenfläschchen aus Glas gelagert.	1 Jahr
Natriumsele- nit	100 mg Natriumselenit wurden in 5 ml Millipore gelöst und die Lösung steril filtriert. 1 ml dieser Lösung wurde mit 39 ml Millipore verdünnt und bei -80 °C gelagert.	mehrere Jahre

Tabelle 10. Arbeitslösungen

Substanz	Herstellung	Haltbarkeit	Menge
Transferrin	100 mg Transferrin wurden in 5 ml Millipore gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.	3 Monate	250 µl Lösung in 500 ml DME/F12
Prolaktin	250 IU Prolaktin wurden in 8,33 ml NaHCO ₃ (pH 8) gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.	6 Monate	2500 µl Lösung in 500 ml DME/F12
Insulin	1 ml der Stammlösung wurde mit 19 ml Millipore verdünnt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei -20 °C gelagert.	6 Monate	1250 µl Lösung in 500 ml DME/F12
Hydrocortison	1 ml der Stammlösung wurde mit Ethanol verdünnt und bei -20 °C gelagert.	6 Monate	500 µl Lösung in 500 ml DME/F12
β-Estradiol	20 µl der Stammlösung (10 mol/l) wurden mit 1,98 ml Ethanol weiter verdünnt (0,1 µmol/l). Die Lösung wurde bei -20 °C vor Licht geschützt in braunen Probenfläschchen aus Glas gelagert.	6 Monate	500 µl Lösung in 500 ml DME/F12
Penicillin/ Strep- tomycin (P/S)	---		3 ml Lösung in 500 ml DME/F12

Fortsetzung Tabelle 10. Arbeitslösungen

EGF	100 µg EGF wurden in 5 ml Millipore gelöst, steril filtriert und zum alsbaldigen Verbrauch bei -20 °C	3 Monate	100 µl Lösung in 200 ml DME/F12
	oder zur längeren Lagerung bei -80 °C gelagert.	mehrere Jahre	
Natriumselenit	52 µl Stammlösung wurden mit 10 ml Millipore verdünnt, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.	1 Monat	200 µl Lösung in 200 ml DME/F12

2.2.1.2 Mediumherstellung

Tabelle 11. H14-Medium Zusätze

Zusatz	x µl /500 ml
Transferrin	250 µl
Prolaktin	2500 µl
Insulin	1250 µl
Hydrocortison	500 µl
β-Estradiol	500 µl
EGF	100 µl
Natriumselenit	200 µl
P/S	3000 µl

Das H14-Medium bestand aus 500 ml DME/F12-Medium versetzt mit Transferrin, Prolaktin, Insulin, Hydrocortison, β-Estradiol, EGF, Natriumselenit und Penicillin/Streptomycin in den in Tabelle 11 angegebenen Mengen. Für alle Zusätze bis auf Transferrin, Prolaktin und EGF wurden Stammlösungen für die spätere Herstellung der Arbeitslösungen angesetzt (2.2.2.1). Die Herstellung der Mediumszusätze und des H14-Mediums erfolgt analog des „Human cell books“ (Blaschke et al., 1994). Erst durch Zugabe von Natriumselenit und EGF entstand H14+-Medium, welches als Medium für die PBC und die Kulturen verwendet wurde. Das H14-Medium ohne Zusatz von Natriumselenit und EGF war einen Monat haltbar, das H14+-Medium war 7 Tage haltbar. Das Fibroblastenmedium bestand aus 500 ml DMEM versetzt mit 3 ml P/S und 50ml FCS.

2.2.1.3 Weitere selbst hergestellte Lösungen

Tabelle 12. weitere selbst hergestellte Lösungen

Bezeichnung	Herstellung
PBS 20x	Für 1000 ml PBS 20x wurden 160,00 g NaCl, 4,00 g KCl, 4,800 g KH_2PO_4 und 33,59 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ abgewogen und in 800 ml Millipore gelöst. Der pH wurde mit NaOH 1M auf 7,4 eingestellt.
4% Paraformaldehyd	2 ml PBS 20x und 20 ml Millipore wurden mit 10 ml 16% Paraformaldehyd gemischt. Mit Millipore auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt. Es wurde gut gemischt und die Lösung bei 4 °C aufbewahrt.
0.1 M Glycin in PBS	3,75 g Glycin wurden in 475 ml Millipore gelöst. Mit PBS 20x wurde auf 500 ml aufgefüllt. Es wurde alles gut gemischt und die Lösung bei 4 °C aufbewahrt.
0.02% Triton X-100	20 µl Triton X-100 und 5 ml PBS 20x wurden gemischt. Mit 95 ml Millipore wurde auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt.
Blockierlösung	2,5 ml PBS 20x, 1,5 ml Ziegenserum und 46 ml Millipore wurden gemischt und die Lösung steril filtriert. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.
DAPI	Für die Kernfärbung wurde eine DAPI-Konzentration von 0,125 µg/ml in 400 µl verwendet. Hierfür wurde 1 µl Grundlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml mit 99 µl Blockierlösung verdünnt und anschließend 1 µl der entstandenen 50 µg/ml-Lösung mit 399 µl Blockierlösung gemischt.

2.2.2 Zellkulturexperimente

2.2.2.1 Teilen der Zellen

Zum Teilen wurde das Medium mit dem Vakuumsauger aus der Flasche gesaugt und die auf dem Boden der Flasche verbliebenen Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin hinzu gegeben (T25-Flasche ca. 0,5 - 0,7 ml Trypsin, T75-Flasche 1,0 - 1,2 ml Trypsin). Die mit Trypsin versetzten Flaschen wurden für ungefähr eine Minute im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde beurteilt, ob sich alle Zellen gelöst haben. War dies nicht der Fall, so wurden die Zellen für eine weitere Minute in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde Trypsin-Inhibitor (1,0 bzw. 2,0 ml) hinzugegeben und die Zellen in ein 50 ml - Röhrchen pipettiert. Der Boden der Flasche wurde mit 10 ml DME/F12-Medium gespült und ebenfalls in das 50 ml – Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 1350 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit dem entsprechenden Medium – H14 für PBC oder DMEM-Medium für HMF - resuspendiert und in jeweils zwei neue Kulturflaschen gefüllt. Die Passagenummer wurde um eins erhöht.

2.2.2.2 Partielles Trypsinieren

Nach der Isolierung von Primärtumorzellen wuchsen in den Kulturflaschen häufig neben den PBC auch Fibroblasten, die trotz Filtration und Zentrifugation mitisoliert wurden. Diese wuchsen im H14-Medium schneller als die PBC. Das Phänomen, dass sich die Fibroblasten nach

Zugabe von Trypsin schneller vom Boden lösen als die PBC wurde genutzt, um Kulturflaschen teilweise zu trypsinieren (Jones, 2008). Hierzu wurden die Zellen, wie unter 2.2.2. beschrieben, vorbereitet und in den Brutschrank gestellt. Nach ca. 30 Sekunden wurde unter dem Mikroskop nach verbliebenen Fibroblasten gesucht sowie die Form der PBC beurteilt. Zellen, die kurz vor dem Ablösen waren, rundeten sich ab und erschienen dadurch heller. Waren alle Fibroblasten gelöst, oder waren die PBC kurz vor dem Ablösen, wurde der Überstand ohne vorherige Zugabe von Trypsininhibitor mit dem Vakuumsauger abgesaugt. Erst nach dem Absaugen wurde das Trypsin neutralisiert und H14-Medium hinzugegeben.

2.2.2.3. Isolierung der PBC aus den Primärtumoren

Die Operationspräparate (Segmentektomie- oder Mastektomiepräparate) stammten von insgesamt 69 Patientinnen der Frauenklinik Kiel des UKSH (Campus Kiel) mit primär invasivem und nicht vorbehandeltem Mammakarzinom. Ein entsprechender Antrag auf Genehmigung der Probengewinnung und -prozessierung durch die Ethikkommission des UK-SH wurde gestellt und bewilligt. Jede Patientin war nach entsprechender Aufklärung damit einverstanden, dass aus einem Anteil ihres OP-Präparates Gewebe für das PBC-Projekt entnommen und somit für zusätzliche wissenschaftliche Untersuchungen benutzt wurde. Unmittelbar postoperativ wurde im Institut für Pathologie des UKSH (Campus Kiel) aus den makroskopisch sichtbaren Tumoren Gewebe gewonnen. Das Gewebe wurde während des Transports bis zur Verarbeitung auf Eis gelagert.

Das Tumorgewebe wurde unter sterilen Bedingungen von sichtbarem Fett befreit und in ca. 1 mm große Gewebstückchen zerkleinert. Für die später folgenden RNA-Analysen und die histologische Sicherung des Tumors wurden zusätzlich Gewebstücke bei -80°C eingefroren. Das für die Isolation bestimmte Tumorgewebe wurde in steril filtriertem, kaltem DMEM (fünffaches Volumen der Probengröße) mit 2 mg/ml Kollagenase I und 2 mg/ml Hyaluronidase bei 37°C unter konstanter Bewegung für mindestens zwei Stunden angedaut. Dann wurde das Gewebe für 10 Minuten bei 3000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet mit ca. 20 ml HBSS gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 3000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in Trypsin/EDTA 0,25% (zehnfaches Probenvolumen) resuspendiert und bei 37°C unter konstanter Bewegung für 10 Minuten inkubiert. Die Suspension wurde mit eiskaltem DME/F12-Medium (fünffaches Probenvolumen) verdünnt und durch 100 µm und 40 µm Zellsiebe gefiltert. Die so isolierten PBC wurden zur Weiterbearbeitung bei 3000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal abgesaugt, das Pellet in H14-Medium resuspendiert und je nach Probenausgangsgröße in eine T25 oder T75-Kulturflasche gegeben. Die Zellen wurden in H14-Medium bei 37° in einer feuchten, 5 % CO₂ enthaltenden Atmosphäre kultiviert.

Für eine T25-Kulturflasche wurden 6 ml H14+-Medium, für eine T75-Kulturflasche 11 ml H14+-Medium verwendet. Am ersten Tag nach der Isolation wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Verunreinigungen durch andere Zellen (v.a. Erythrozyten) zu beseitigen. Danach wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt.

2.2.2.4 Ansetzen einer dreidimensionalen Zellkultur

Dreidimensionale Mono- und Cokulturen (Abbildung 3) wurden angesetzt, sobald die PBC eine ausreichende Zelldichte erreicht hatten. Dieses war zwischen dem 8 und 35 Tag ($\bar{X} = 21$) nach Isolierung der Fall. Die HMF wurden nach Möglichkeit am sechsten Kulturtag verwendet. Als Erstes erfolgte jeweils die Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflaschen. Die PBC wurden zunächst partiell trypsiniert, um Verunreinigungen durch primäre Fibroblasten zu verhindern. Es wurde wie in 2.2.2.2 verfahren, allerdings wurde nach dem Absaugen der Fibroblasten mit PBS gewaschen und erneut Trypsin hinzugegeben. Danach wurden die HMF, wie in 2.2.2.1 beschrieben, vorbereitet, allerdings entfiel der Schritt des Zentrifugierens. Um eine möglichst definierte Zellzahl in der Kultur verwenden zu können, wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauerkammer gezählt.

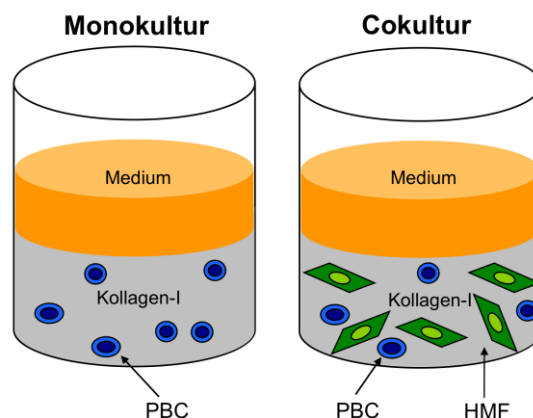


Abbildung 3. Schematische Darstellung der dreidimensionalen Zellkulturen

Beide Zellarten wurden auf die gleiche Weise gezählt. Angelehnt an die Zellverhältnisse in vivo wurden die PBC und HMF in einem 1:2- Verhältnis verwendet. Es wurden immer $0,05 \times 10^6$ PBC und $1,0 \times 10^6$ HMF verwendet. Für eine 12-Loch Platte wurden 0,6 ml/Loch Kollagenlösung verwendet. Der Ansatz der Kollagen-Lösung für eine Mono- und eine Cokultur auf einer 12-Loch Platte wurde wie folgt berechnet (s. auch Tabelle 13):

Kollagen Stamm-Konzentration (vom Hersteller angegeben): z.B. 3,35 mg/ml

benötigte Kollagen-Konzentration: 1,625 mg/ml

endgültige Kollagen-Konzentration in der Kultur: 1,3 mg/ml

verwendetes Volumen: 0,6 ml/Loch (12-Loch Platte)

Tabelle 13. Beispielrechnung einer Kollagen-Lösung

TCV: benötigtes totales Kollagenvolumen +25% (in ml)	$2 \times 0,6 \text{ ml} + 25\% = 1,5 \text{ ml}$
benötigtes Kollagenvolumen (mg)	$1,625 \text{ mg/ml} \times 1,5 \text{ ml} = 2,438 \text{ mg}$
Kollagenverdünnung: $C = (\text{TCV (mg)} / \text{Stammkonzentration (mg/ml)})$	$C = 2,438 \text{ mg} / 3,35 \text{ mg/ml} = 0,728 \text{ ml}$
$4 \times \text{PBS} (0,5 \times C) = P$	$P = 0,5 \times 0,728 = 0,364 \text{ ml}$
Medium: $M = \text{TCV} - C - P$	$M = 1,5 \text{ ml} - 0,728 \text{ ml} - 0,364 \text{ ml} = 0,407 \text{ ml}$

Nach der Berechnung wurden die Zellen 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurde die Kollagen-Lösung pipettiert (im gegebenen Beispiel wurden also 728 µl Kollagen-I, 364 µl PBS und 407 µl in ein 15 ml – Röhrchen pipettiert). Durch Zugabe von NaOH 1M wurde die Lösung auf einen pH von 7,4 eingestellt. Die Zellsuspension-Röhrchen für die Mono- und die Cokultur wurden, wie in Tabelle 14 dargestellt, vorbereitet und ein Pipettierverlust von 10% einkalkuliert. Je 750 µl Zell-Kollagen-Suspension wurden gleichmäßig auf den Boden des Lochs pipettiert und sofort in den Inkubationsschrank gestellt. Nach einer Stunde waren die Gele nicht mehr flüssig, und 1,5 ml Medium wurden hinzugefügt. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Tabelle 14. Berechnung der Zellsuspension

	Monokultur	Cokultur
PBC	50 µl	50 µl
HMF	-----	100 µl
Medium	100 µl	-----
Kollagen-I	600 µl	
Totales Vol./Loch	750 µl	

2.2.2.5 Fixieren der Gele

Nach 9-10 Tagen wurden die Kollagengele fixiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Gele zweimal mit 1,5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl 4% Paraformaldehyd-Lösung hinzugefügt und die Gele für 15-20 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Gele dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen und 1ml 0,1 - 0,15 M Glycin in PBS hinzugefügt. Die Gele wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag mit PBS gewaschen.

2.2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Tag 1

Die fixierten Gele wurden für die Objektträger zugeschnitten und in eine 12-Loch Platte gelegt. Um die Zellmembranen zu permeabilisieren, wurde zu jedem Loch je 1 ml 0,02% Triton-X hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Triton-X aspiriert und die Gele für 10-15 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit 1-2 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde danach ebenfalls aspiriert und 500 µl Blockierlösung hinzugefügt. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Blockierlösung abgesaugt, 400 µl des primären Antikörpers hinzugegeben und in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert.

Tag 2

Die Antikörperlösung wurde abgesaugt und die Gele auf dem Schüttler dreimal bis viermal für jeweils 10 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 400 µl des sekundären Antikörpers hinzugegeben und auf dem Schüttler für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der sekundären Antikörper musste für die Inkubation, sowie für alle weiteren Arbeitsschritte die Platte abgedeckt werden. Die Antikörper wurden wieder aspiriert, die Gele drei- bis viermal für jeweils 10 Minuten mit PBS und danach zweimal, für jeweils fünf Minuten, mit Millipore gewaschen. Für beide Waschschrte wurde die Platte auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurden 400 µl DAPI hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Gele wurden anschließend noch einmal für 10 Minuten auf dem Schüttler mit PBS gewaschen und danach auf einen Objektträger gelegt. Mit einer Pipette wurde vorsichtig verbliebene Flüssigkeit abgesaugt. Um einen rapiden Fluoreszenzverlust während des Mikroskopierens zu verhindern, wurden die Gelstücke mit Eindeckmedium benetzt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Ränder wurden mit Nagellack versiegelt.

2.2.3. Auswertung der dreidimensionalen Zellkulturen

2.2.3.1 Quantitative Analyse des Zellwachstums

Für die quantitative Analyse der Kulturen wurden das Gesamtwachstum der PBC an Tag 9-10 mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Hierfür wurden die Gele mit dem Epithelzellmarker Pancytokeratin gefärbt und jeweils 12 Gesichtsfelder der Mono- und Cokulturen in 250-facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop und der Zeiss AxioVision Software aufgenommen. Mit Hilfe der ImageJ Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) wurde die Größe der Zellcluster evaluiert. Bauer et al. zeigten eine hoch positive Korrelation zwischen Anzahl der Zellkerne und der per *ImageJ* ermittelten Pancytokeratin-positiven Fläche (Bauer et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden die Kulturen im Hinblick auf die Anzahl und die

Größe der Pancytokeratin-positiven Fläche untersucht. Weiterhin wurde das Gesamtwachstum der PBC durch Bildung des Quotienten aus der Summe aller Pancytokeratin-positiven Flächen eines Bildes (in Pixel) und der totalen Bildgröße (in Pixel) berechnet. Die mittels ImageJ ermittelten Werte wurden in Excel weiter bearbeitet. Für jedes Wertepaar wurde für Mono- versus Cokultur ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Für p-Werte $< 0,05$ bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Mono- und Cokultur.

2.2.3.2 Qualitative Analyse des Zellwachstums

Die morphologische Analyse einer Kultur und somit die Determinierung einer Reversion erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen. Eine Reversion wurde definiert als die Ausbildung von drüsenähnlichen Azini mit polarisierter Ausrichtung der Zellachse, zentraler Lumenformation und strukturiertem Wachstum durch die Tumorzellen in der dreidimensionalen Cokultur im Vergleich zu einem unstrukturierten, invasionsähnlichem Wachstum in der Monokultur. Die Polarität der Zellen wurde definiert durch die apikale Expression von Golgin, die apicolaterale Expression von β -Catenin, Colokalisation von e-cadherin und β -Catenin an den Zell-Zell-Kontakten und die basale Expression von $\beta 4$ -Integrin und $\beta 1$ -Integrin der PBC (Debnath und Brugge, 2005; Paszek et al., 2005; Weaver, V. M. et al., 1997).

Mono- und korrespondierende Cokultur wurden im Vergleich zueinander analysiert. Es wurden von jeder Mono- und Cokultur jeweils 10 Bilder in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Ein Minimum von 60 Zellaggregaten wurde ihrer Morphologie nach eingeteilt und ausgezählt. Dabei wurden folgende drei Wachstumsmuster morphologisch definiert:

- **Typ 1:** Die PBC wuchsen einzeln und zeigten keine Polarität.
- **Typ 2:** Die PBC formten ungeordnete, lockere Kolonien, die mindestens doppelt so lang wie breit waren. Die Zellen zeigten eine diffuse Markerexpression und keine Polarität.
- **Typ 3:** Die PBC formten runde, regelmäßig konfigurierte, polarisierte Zellaggregate (Definition von Polarität s.o.).

Mit Hilfe eines zweiseitigen t-Tests wurden die Ergebnisse für die Typ 3-Aggregate der Monokultur gegen die der Cokultur hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz analysiert. Kulturen mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als revertiert definiert.

2.2.4 Genexpressionsanalysen

2.2.4.1 Erstellung einer molekularen Signatur der Tumorproben

Das RNA aus dem Tumorgewebe von je 5 revertierten und nicht-revertierten Proben wurde mit dem RNeasy® Micro Kit nach Herstellerangaben gewonnen. Die weitere Bearbeitung der RNA und die Herstellung der Genchips erfolgte durch das Institut für Transfusionsmedizin des UKSH (Campus Kiel). Mittels des Agilent RNA 6000 Nano Kits (benutzt nach Herstellerangaben) und anschließender Auswertung durch den Agilent BioAnalyzer wurde die Qualität der RNA-Proben ermittelt. Außerdem wurde nur RNA mit einer 260 nm/280 nm-Ratio über 1,8 weiter verwendet. Die quantitative Analysen erfolgte durch photometrische Auswertung mit einem Spectralphotometer (Ultrospect 3100 pro). Für die Herstellung der Genchips wurde das Amino Allyl MessageAMP™ aRNA Kit verwendet. Es wurde aus 3 µg RNA über einen Zwischenschritt doppelsträngige cDNA geschrieben, gereinigt, mit aaUTP (Biotin) markiert und amplifiziert. Die entstandene Aminoallyl-RNA (aRNA) wurden wiederum aufgereinigt und mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) - Esther markiert. Die auf diese Weise vorbereiteten aRNA-Fragmente wurden für 16 Stunden bei 45°C mit dem Human Genome U133 Plus 2.0 Genchips hybridisiert. Alle weiteren Schritte (Waschen, Färben mit Streptavidin-Phycoerythrin und Scannen des Signals) erfolgten nach Herstellerangaben.

Die vom Scanner generierten Cel-files wurden mit der Software "Affymetrix Expression Console" eingelesen und analysiert. Als Analyse Methode wurde "3' Expression Arrays – MAS5" verwendet mit der Einstellung "TGT 500" und "Scale to all probe sets."

Mit Hilfe dieses Analyseverfahrens wurden die jeweiligen Expressionswerte und die dazugehörigen p-Werte ermittelt. Der p-Wert ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes Transkript exprimiert wird und wird als "Detektionsscore" verwendet. Als Schwelle zum Filtern der Daten wird ein p-Wert von $\leq 0,05$ oder 5% Irrtumswahrscheinlichkeit angenommen, d.h. nur Transkripte mit einem p-Wert $\leq 0,05$ werden als exprimiert bzw. *present* gewertet.

2.2.4.2 Auswertung der Genchip-Daten

Im Folgenden wurden die Expressionswerte und p-Werte in eine Datenbank eingelesen und mit der Software CorrXpression weiter analysiert. Die Software wird in mehreren Publikationen ausführlich beschrieben (Charité; Klein et al., 2005; Wessel et al., 2006).

Auf dem Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip sind 54675 Transkripte enthalten. Zunächst wurden diejenigen Transkripte eliminiert, die in allen zehn Brustkrebsproben nicht exprimiert sind. Alle weiteren Analysen wurden dann mit den 40584 exprimierten Transkripten durchgeführt. Weiterhin wurden die zehn Genexpressionsprofile normalisiert, d.h. der Mittelwert für jedes Experiment wurde in Bezug gesetzt zu dem ermittelten Gesamtmittelwert.

Zur Bestimmung der differentiell exprimierten Gene wurden die jeweils fünf revertierenden und nicht-revertierenden Tumore in Gruppen gefasst. Über- und Unterexpression liegt vor, wenn ein Transkript in allen Experimenten der jeweiligen Gruppe (z.B. revertierende Tumore) um den Faktor 2 höher oder niedriger exprimiert wird als in der anderen Gruppe (nicht revertierende Tumore). Diese sehr stringente Analyse führte allerdings nur zu zwei differentiell exprimierten Genen, so dass aufgrund der Heterogenität der Tumore die Bedingungen der Ratio-Analyse abgeschwächt wurden. Für jedes Transkript wurden zwischen den beiden Gruppen 25 Einzelvergleiche durchgeführt (jeder Tumor der einen Gruppe mit jedem Tumor der anderen Gruppe). Von diesen 25 Einzelvergleichen mussten 19 um den Faktor 2 unterschiedlich sein, damit ein Transkript als differentiell exprimiert betrachtet wurde; d.h. 75 % der Vergleiche zwischen den beiden Experimentengruppen mussten mindestens um den Faktor 2 unterschiedlich sein.

Um die Signifikanz dieser Analysen zu überprüfen und die differentiell exprimierten Transkripte weiter zu validieren, wurde ein ungepaarter *Student's t-test* für jedes Transkript, bezogen auf die beiden Experimentengruppen durchgeführt. Alle ermittelten p-Werte waren < 0,05 und somit signifikant.

2.2.4.3 Validierung der Genchip-Daten mittels semiquantitativer RT-PCR

Tabelle 15. qRT-PCR Protokoll

Denaturierung	95°C	3 min	1 Zyklus
Annealing	95°C	30 sec	40 Zyklen
	64°C	7 sec	
	72°C	7 sec	
	95°C	95 sec	
Schmelzkurve	64°C	10 sec	62 Zyklen*
Stop	4°C	---	

*(nach dem 2. Zyklus wurde um 0,5°C/Zyklus erhöht)

Das Schreiben der cDNA erfolgte mit dem QuantiTect® Reverse Transkriptase Kit nach Herstellerangaben. Es wurde 1 µg RNA verwendet. Die Primer wurden aliquotiert und in einer Konzentration von 20 µmol/µl verwendet. Für das qRT-PCR-Reagenz wurden 12,5 µl SYBR Green Supermix, 2,5 µl Primer und entweder 8 µl Wasser oder 4 µl Wasser und 4 µl MgCl₂ auf Eis pipettiert. PIP, LINGO1, ZMYND11 und MAP6 wurden mit MgCl₂ benutzt, MUCL1, ELF5 und SQLE wurden nur mit Wasser benutzt. 2 µl cDNA aus den Patientinnenproben wurden vorgelegt und 23 µl des bereits fertig gemischten Reagenz hinzugefügt. Als Haushalts-Gen diente 28SR. Die Proben wurden mit dem iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System des Institutes für Immunologie am UKSH (Campus Kiel) analysiert. Das qRT-PCR-Protokoll findet sich in Tabelle 15. Als Richtwert für die Qualität der qRT-PCR galten eine Korrelation von 1,0, eine Steigung der Schmelzkurve von -3,4 und eine Effizienz von 80-

100%. Alle Experimente wurden zweimal ausgeführt und in den einzelnen Experimenten die Versuchsreihen doppelt pipettiert.

2.2.4.4 Auswertung der qRT-PCR-Daten

Nach doppelter Bestimmung der *cycle threshold* (cT)-Werte für alle Test-Gene und das Haushalts-Gen, wurde aus den cT-Werten der Mittelwert gebildet. Die cT-Werte für das Haushalts-Gen wurden mit eins festgelegt und alle anderen Daten mit Hilfe des Quotienten $\frac{cT[Testgen]}{cT[Housekeeping - Gen]}$ gegen diesen Wert normalisiert. Außerdem wurden die ΔcT -Werte durch

Berechnung von $cT[Testgen] - cT[Housekeeping - Gen]$ bestimmt.

Die *fold change* der cT- Werte wurde mit folgender Formel berechnet:

$$foldchange = 2^{(cT^{nicht-revertiert} - cT^{revertiert})} / 2^{(cT^{28sRNA\ nicht-revertiert} - cT^{28sRNA\ revertiert})} \quad (\text{s. Anhang}).$$

Die *fold change* entspricht der n-fachen Differenz zwischen zwei Wertemengen. Der errechnete Wert ist positiv, wenn die Genmenge eines Gens gegenüber dem *housekeeping*-Gen erhöht ist bzw. negativ, wenn sie erniedrigt ist. Ein negativer Zusammenhang wurde durch zusätzliche Berechnung von $-(1/foldchange)$ dargestellt. Die *fold change* der cT-Werte und der Genchip-Werte wurden als Wertemengen für die Y-Achsen in ein Diagramm übertragen. Die X-Achse wurde von den Test-Genen gebildet.

Um den monotonen Zusammenhang der Affymetrix GeneChips und der qRT-PCR-Daten statistisch zu validieren, wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient gewählt. Dieser war weniger anfällig gegen Ausreißer im Datenbestand und darum aufgrund der Datenlage zu bevorzugen. Bezüglich eines statistischen Tests, ob sich der Spearman Rangkorrelationskoeffizient signifikant von Null unterscheidet, wurde eine Normalverteilung der Daten nicht vorausgesetzt. Zur Schätzung des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten wurde die folgende Formel benutzt:

$$\hat{\rho}_{XY} = 1 - \frac{6 \cdot \sum_{i=1}^n (rg[x_i] - rg[y_i])^2}{n \cdot (n^2 - 1)}$$

Hierbei waren $rg[x]$ und $rg[y]$ die den x- und y-Werten zugewiesenen Ränge. Kam ein Rang mehrmals vor, so wurden mittlere Rangzahlen vergeben. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ist dimensionslos und misst die Stärke und Richtung des monotonen Zusammenhangs.

Darüber hinaus wurde mit einem angenommenen Signifikanzniveau von 5% getestet, ob sich der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient signifikant von Null unterscheidet.

3. Ergebnisse

Das Stroma spielt eine entscheidende Rolle in der Regulierung des Wachstumsverhaltens von normalen und neoplastischen Zellen. Durch Manipulation des *tumormicroenvironment* kann eine Reversion des malignen Phänotyps induziert werden. Da durch die Tumorentstehung die Homöostase des Stromas zerstört wird, liegt dieser Arbeit die Vermutung zugrunde, dass die Konfrontation von Brustkrebszellen mit gesundem Stroma die Brustdrüsenarchitektur reetablieren kann. Um die Mechanismen, die zu einer Reversion des malignen Phänotyps beim Mammakarzinom führen, zu identifizieren und zu charakterisieren, wurden primäre Mammakarzinomzellen (PBC) sowohl als Monokultur als auch als Cokultur mit normalen Mammastromafibroblasten (HMF) in einem dreidimensionalen Gel aus Kollagen-I kultiviert.

3.1 Charakteristika der Patientinnenproben

Die Zellen für die Versuche in dieser Arbeit wurden ausschließlich von Patientinnen der Universitätsfrauenklinik in Kiel isoliert, die an einem primären Mammakarzinom erkrankt waren und keine neoadjuvante Behandlung erhalten hatten. Insgesamt wurden aus 70 Patientinnenproben PBC gewonnen. Von 13 Patientinnen konnten die PBC sowohl erfolgreich isoliert als auch in der dreidimensionalen Zellkultur kultiviert werden. Eine Gefrierschnittanalyse der gewonnenen Gewebeproben wurde zur histologischen Sicherung des Tumors verwahrt und später durch einen Pathologen des Institutes der Pathologie am UKSH (Campus Kiel) gesichtet. Als erster Schritt auf der Suche nach Merkmalen der Reversionsreaktion wurde versucht, etablierte klinisch-pathologische Prognosemarker beim Mammakarzinom mit der Revertierbarkeit der PBC in Cokultur mit HMF zu assoziieren (Tabelle 16). Die PBC wurden aus dem Gewebe von neun invasiv-duktalem, drei invasiv-lobulärem und einem neuroendokrinen Karzinom gewonnen. Diese zeigen ein heterogenes Verteilungsmuster im Bezug auf das Tumorstadium, das Grading, den Her2Neu-Status und den Lymphknotenstatus. Mit einer Ausnahme waren alle Tumoren Östrogen- und/oder Progesteron-Rezeptor positiv.

Es konnte keine Prognose des Wachstumsverhaltens der Zellen in vitro abhängig von dem Tumorstadium bzw. der Tumoreigenschaften abgegeben werden. Somit ist es also nicht möglich, die histopathologischen Eigenschaften eines Tumors mit der Revertierbarkeit des malignen Phänotyps der aus diesem Tumor gewonnenen PBC zu assoziieren. Der Reversionsprozess scheint unabhängig von diesen Parametern zu sein.

Tabelle 16. Histopathologische und klinische Charakteristika der untersuchten Patientinnenproben

ID	Alter (Jahre)	Histol. Subtyp	Tumorstadium (T)	Lymphknoten-status (N)	Grading (G)	ER/PR	Her2+	Reversion
1	81	invasiv-dukta	pT4b	x	G3	12/2	0	+
2	84	ductulo-lobulär	pT4b	x	G2	12/6	0	+
3	71	invasiv-dukta	pT1c	pN0 (0/4)	G3	6/0	3	+
4	84	invasiv-dukta	pT1b, pTis (DCIS)	pN0 (0/2)	G1	12/12	1	+
5	45	invasiv-dukta	pT1c, pTis (DCIS)	pN0 (0/24)	G3	8/4	0	+
6	63	invasiv-dukta	pT2	pN1mic (1/18)	G2	12/12	0	-
7	45	invasiv-dukta	pT1b	pN1a (1/24)	G3	0/0	0	-
8	71	invasiv-dukta	pT4b	pN2a (8/10)	G2	12/9	0	-
9	61	invasiv-lobulär	pT2	pN0 (0/5)	G2	12/8	0	-
10	72	neuroendokrin	pT3	pN0 (0/7)	G2	12/12	0	-
11	73	invasiv-lobulär	pT3	pN2a (8/17)	G2	12/6	0	-
12	43	invasiv-dukta	pT1c	pN0 (0/4)	G3	8/6	1	-
13	48	invasiv-dukta	pT3	pN3a (12/12)	G1	12/12	0	-

ER: Östrogenrezeptor, PR: Progesteronrezeptor, +: Reversion erfolgt, -: Reversion nicht erfolgt, x:keine Information

3.2 Morphologische Analyse der dreidimensionalen Zellkulturen

Nach einer Kultivierung von 9-10 Tagen und anschließender Immunofluoreszenzfärbung der Gele wurden die Zellaggregate anhand ihrer Form und ihrer Differenzierung in drei Gruppen eingeteilt (s. 2.2.3.2). Eine Kultur wurde dann als revertiert bezeichnet, wenn in der Cokultur statistisch signifikant mehr polarisierte Azini nachgewiesen wurden als in der korrespondierenden Monokultur (s. 2.2.3.2).

In 5 von 13 Fällen (38%) induzierten humane Mammastromafibroblasten ein benignes Wachstums der primären Mammakarzinomzellen in der Cokultur im Vergleich zur korrespondierenden Monokultur ($p \leq 0,02$) (Abbildung 4). Diese Kulturen wurden als phänotypisch revertiert definiert. Das Wachstumsmuster der primären Mammakarzinomzellen in den revertierten Cokulturen wies ausgeprägte Ähnlichkeiten mit der Gewebearchitektur der normalen Brustdrüse auf. Die PBC wuchsen in rundlichen, azinus-ähnlichen Zellclustern, welche von den Fibroblasten eng umgeben waren. Innerhalb dieser Azini waren die polarisierten PBC regelmäßig um ein zentrales Lumen angeordnet.

Als Zeichen der baso-apicalen Ausrichtung der Zellachse in den Azini konnte eine apikale Expression von Golgin und ZO-1 sowie eine basale Expression von $\beta 4$ -Integrin und $\beta 1$ -Integrin nachgewiesen werden (Abbildung 5A). Die basale Expression der Integrine lässt vermuten, dass sich zusätzlich zu der baso-apicalen Ausrichtung der Zellachse eine den Azinus umgebene Basalmembran gebildet hat. Der durch die Azinusbildung entstandene Zell-Zell-Kontakt führte zu einer apicolateralen Expression von β -Catenin (Abbildung 5A).

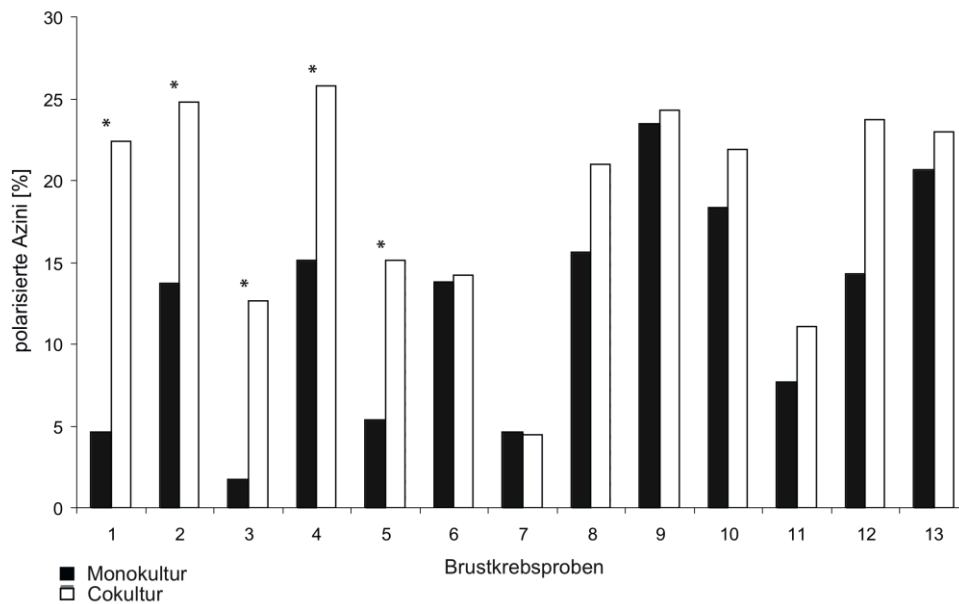


Abbildung 4. Qualitative Analyse des Wachstums der PBC in Mono- und Cokultur

Proben 1-5 sind revertiert in der Cokultur im Vergleich zur Monokultur, Proben 6-13 sind nicht revertiert. Insgesamt wurden 13 PBC-Cokulturen mit HMF ausgewertet. Es wurden mind. 60 Zellcluster (640x Vergrößerung) hinsichtlich ihrer Differenzierung beurteilt. Fünf Proben zeigen einen signifikant höheren Anteil polarisierter Azini in der Cokultur ($p \leq 0,02$) im Vergleich zur Monokultur. Die mit Stern bezeichneten Balkenpaare zeigen einen statistischen signifikanten Unterschied zwischen der Mono- und Cokultur.

Acht Cokulturen (62%) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied in ihrer Zellmorphologie im Vergleich zur korrespondierenden Monokultur (Abbildung 4). Anders als die PBC in den revertierten Cokulturen zeigten die gleichen PBC in der Monokultur ein unorganisiertes, karzinomähnliches Wachstumsmuster. Sie bildeten keine polarisierten Azini mit einem zentralen Lumen aus, sondern wuchsen in länglichen, locker angeordneten Zellclustern oder als einzelne Zellen. Es war weder eine apikale Expression von Golgin und ZO-1 noch eine basale Expression von $\beta 4$ -Integrin und $\beta 1$ -Integrin. Vielmehr konnte eine disseminierte, über alle Zellpole verteilte Expression dieser Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 5A). Der Zell-Zell-Kontakt innerhalb der unpolarisierten Zellcluster führte im Kontrast zur revertierten Cokultur nicht zu einer apicolateralen Expression von β -Catenin. Es zeigte sich hier das gleiche disseminierte Expressionsmuster wie für Golgin, ZO-1, $\beta 4$ - und $\beta 1$ -Integrin.

PBC in den Monokulturen exprimierten zusätzlich zu Pancytokeratin Vimentin. In Karzinomzellen ist häufig eine Expression von Vimentin nachweisbar; sie gilt als Marker für die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) (Thiery, 2002). Im Kontrast zur Monokultur war in den revertierten Cokulturen die Vimentinexpression ausschließlich in den HMF nachweisbar (Abbildung 5B).

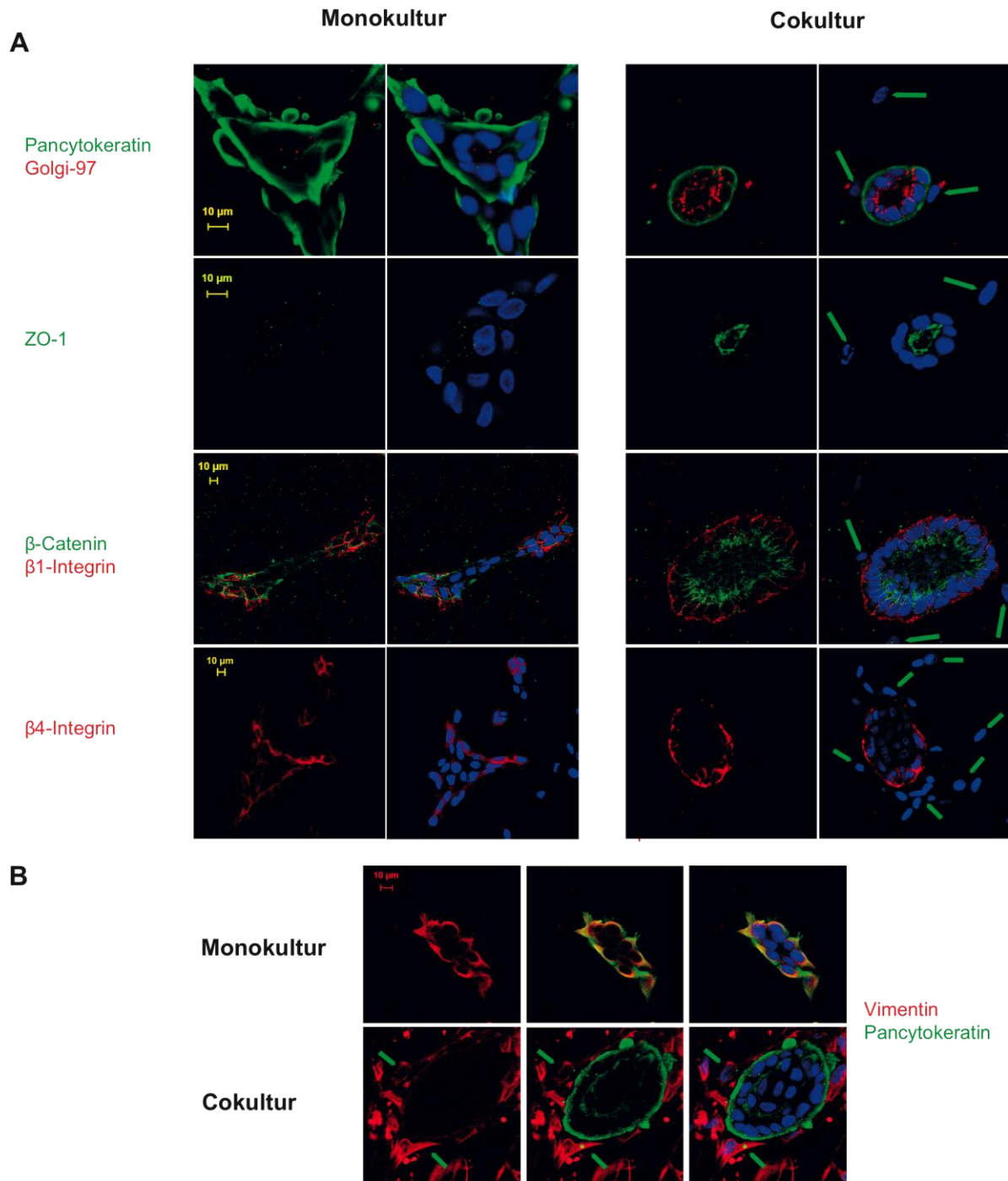


Abbildung 5. Morphologie der PBC in Mono- und revertierter Cokultur.

A. Morphologie der PBC in der Monokultur (linke Spalte) im Vergleich zur Cokultur mit HMF (rechte Spalte). Es wurden apikale (Golgin-97 [rot] und ZO-1[grün]), basale (β 4-Integrin [rot]), basolaterale (β 1-Integrin [rot]) und laterale (β -Catenin [grün]) Polaritäts-Marker und Epithelzellmarker (Pancytokeratin [grün]) gefärbt. Eine Kernfärbung mit DAPI [blau] verdeutlicht die Kernanordnung innerhalb der Zellcluster. In der jeweils zweiten Spalte wurden die Mono- und Cokultur-Bilder und die DAPI-Färbung übereinander gelagert. Grüne Pfeile: HMF in der Cokultur. **B.** PBC in der revertierten Cokultur zeigen eine geringere Vimentin-expression [rot] im Vergleich zur Monokultur. Man beachte, dass die HMF (grüne Pfeile) den durch die PBC gebildeten Azinus eng umgeben. Die Kerne wurden mit DAPI [blau] gefärbt. Zweite Spalte: Übereinanderlagerung der Vimentin- und Pancytokeratinfärbung. Dritte Spalte: wie zweite Spalte, zusätzlich Einblendung der DAPI-Färbung.

Wenngleich eine Reversion in fünf Kulturen beobachtet wurde, waren dennoch durchschnittlich bis zu 66% Typ-1- und bis zu 17% Typ-2-Aggregate in den Kulturen zu finden (s. Anhang).

3.3 Quantitative Analyse der dreidimensionalen Zellkulturen

Das Wachstumsverhalten der PBC in Mono- und Cokultur wurden nach dem 9. bzw. 10. Kulturtag evaluiert. Die Gele wurden hierfür mit Pancytokeratin gefärbt und im Hinblick auf die mittlere Größe und die Anzahl der Pancytokeratin-positiven Fläche sowie das Gesamtwachstum der PBC in Mono- und Cokultur analysiert (s. 2.2.3.1). Bezüglich der Anzahl der Pancytokeratin-positiven Flächen lässt sich nur für eine revertierte und eine nicht-revertierte Probe ein Unterscheid zwischen Mono- und Cokultur feststellen (Abbildung 6A). Drei der fünf revertierten Cokulturen zeigten einen signifikanten Unterschied für die mittlere Größe der Pancytokeratin-positiven Fläche im Vergleich zur korrespondierenden Monokultur (Abbildung 6B). Da sich Anzahl der Pancytokeratin-positiven Flächen in den revertierten Cokulturen nicht signifikant erhöhte, aber die Größe der Pancytokeratin-positiven Flächen zunahm, ist davon auszugehen, dass die Azinusbildung auf eine konsekutiven Vergrößerung der einzelnen Zellcluster und nicht auf Migration der Zellen im Gel zurückzuführen war.

Durch die Analyse des Gesamtwachstums der PBC in der Cokultur im Vergleich zu Monokultur konnte ebenso ein wachstumsstimulierender Effekt der HMF als Ursache der Reversion ausgeschlossen werden (Abbildung 6C).

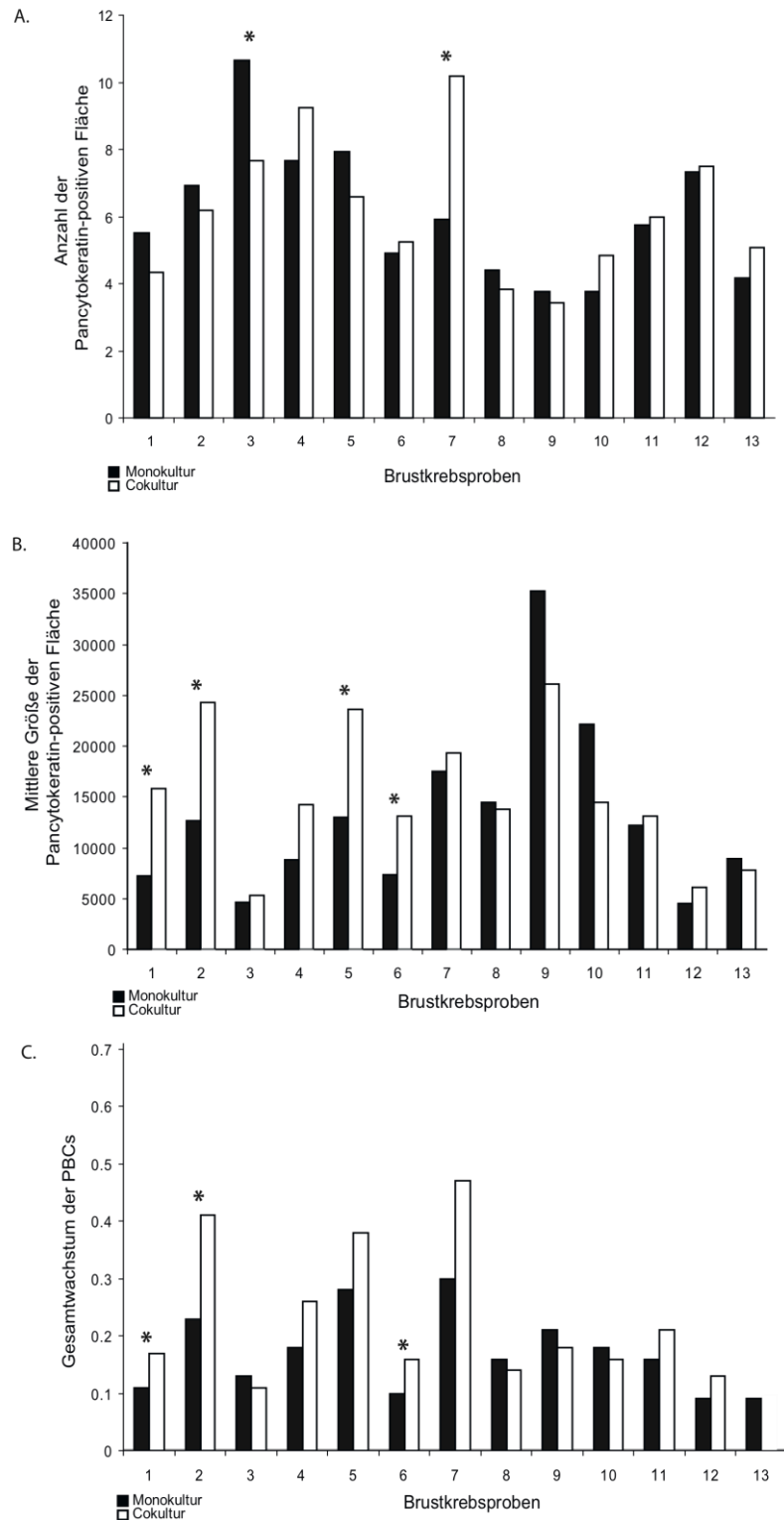


Abbildung 6. Quantitative Analyse des Wachstums der PBC in Mono- und Cokultur

Proben 1-5 sind revertiert in der Cokultur im Vergleich zur Monokultur, Proben 6-13 sind nicht-revertiert. Die Gele wurden bei 250-facher Vergrößerung mit einem Immunfluoreszenzmikroskop fotografiert und je 12 Bilder pro Kultur mit der ImageJ-Software analysiert. Dargestellt wurden die Anzahl (A.) und die mittlere Größe (B.) der Pancytokeratin-positiven Flächen sowie das Gesamtwachstum der PBC (C.) (Quotient aus allen Arealen [Pixel] und totaler Bildgröße [Pixel]) in Mono- und Cokultur. Die mit Sternen bezeichneten Balkenpaare zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Mono- und Cokultur ($p \leq 0,05$).

3.4 Molekulare Signatur der revertierten und nicht-revertierten Tumorproben

Tabelle 17. RNA-Qualität für die Hybridisierung auf dem Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)

ID	Menge RNA [µg/ml]	260nm/280nm-Ratio
1	528	2,12
2	100	2,3
3	604	2,12
4	278	2,12
5	326	2,18
6	524	2,12
7	580	2,10
8	462	2,16
9	618	2,12
10	218	1,8

Um eine molekulare Signatur der revertierten und nicht-revertierten Tumoren zu ermitteln, wurde durch DNA-chip-Technik das Expressionsmuster von je 5 revertierten und 5 nicht-revertierten Tumorproben analysiert. Aus den acht nicht-revertierten Kulturen wurden willkürlich fünf Kulturen ausgewählt, um als Vergleich zu den fünf revertierten Kulturen zu dienen. Wie in Tabelle 17 gezeigt, wurde ausschließlich qualitativ hochwertige RNA für die Hybridisierung mit den Genchips verwendet. Ein Gen wurde dann als über- oder unterexprimiert bezeichnet, wenn seine Expressionsintensität in der Gruppe der revertierten Tumoren um mindestens den Faktor 2 höher oder niedriger war als die Expressionsintensität des gleichen Genes in der Gruppe der nicht-revertierten Tumoren. Diesem Ansatz folgend waren insgesamt 91 Transkripte bzw. 75 Gene differentiell exprimiert.

3.4.1 Gene mit hochregulierter Expression in den revertierten Tumoren

Im Vergleich zu den nicht-revertierten Kulturen zeigten in den revertierten Kulturen 42 Transkripte (36 Gene) eine hochregulierte Expression (Tabelle 18). Als Beispiel können hier *E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)* (ELF5), *prolactin-induced protein* (PIP) und *mucin-like 1* (MUCL1) genannt werden. Die 36 hochregulierten Gene haben bekannte Funktionen in Bereichen der Zelladhäsion, der Signaltransduktion und der Transkription.

Tabelle 18. Transkripte mit hochregulierter Expression in den revertierten Brustkrebsproben (im Vergleich zu den nicht-revertierten Brustkrebsproben)

Affymetrix Probenaset	Gensymbol	Fold Change (revertiert/ nicht-revertiert)	Genname
226147_s_at	PIGR	18,62	polymeric immunoglobulin receptor
229659_s_at	PIGR	9,86	NA
1553602_at	MUCL1	7,71	mucin-like 1
206439_at	EPYC	6,7	epiphykan
206666_at	GZMK	6,09	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)

Fortsetzung Tabelle 18. Transkripte mit hochregulierter Expression in den revertierten Brustkrebsproben

228233_at	FREM1	5,71	FRAS1 related extracellular matrix 1
209867_s_at	LPHN3	5,13	latrophilin 3
205306_x_at	KMO	4,91	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)
204205_at	APOBEC3G	4,77	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
206509_at	PIP	4,77	prolactin-induced protein
206628_at	SLC5A1	4,62	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1
240413_at	PYHIN1	4,56	pyrin and HIN domain family, member 1
211138_s_at	KMO	4,43	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)
213802_at	NA	4,28	NA
244203_at	NA	4,27	NA
204777_s_at	MAL	4,12	mal, T-cell differentiation protein
210072_at	CCL19	4,06	chemokine (C-C motif) ligand 19
1553204_at	NA	4,01	NA
242670_at	LGI4	3,78	leucine-rich repeat LGI family, member 4
214598_at	CLDN8	3,67	claudin 8
231124_x_at	LY9	3,64	lymphocyte antigen 9
230244_at	C2orf82	3,63	chromosome 2 open reading frame 82
229629_at	NA	3,56	NA
204400_at	EFS	3,47	embryonal Fyn-associated substrate
205668_at	LY75	3,45	lymphocyte antigen 75
1569225_a_at	SCML4	3,45	sex comb on midleg-like 4 (Drosophila)
223075_s_at	AIF1L	3,41	allograft inflammatory factor 1-like
220625_s_at	ELF5	3,35	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)
1557564_at	NA	3,19	NA
242773_at	SLC5A1	3,19	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1
216050_at	NA	3,17	NA
1567224_at	HMGA2	3,15	high mobility group AT-hook 2
220646_s_at	KLRF1	3,11	killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1
1555968_a_at	NA	3	NA
237201_at	NA	3	NA
1554250_s_at	TRIM73	2,93	tripartite motif-containing 73
230110_at	MCOLN2	2,88	mucolipin 2
1563473_at	NA	2,85	NA
242388_x_at	T-cell activation GTPase activating protein	2,82	NA
212239_at	PIK3R1	2,72	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
1555392_at	NA	2,7	testin-related protein TRG
212240_s_at	PIK3R1	2,62	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)

3.4.2 Gene mit herunterregulierter Expression in den revertierten Tumoren

49 Transkripte (39 Gene) zeigten in den revertierten Tumoren im Vergleich zu den nicht-revertierten Tumoren eine herunterregulierte Expression (Tabelle 19). Beispiele sind hier *squalene epoxidase* (SQLE), *zinc finger, MYND domain containing 11* (ZMYND11) und *leucine rich repeat and Ig domain containing 1* (LINGO1). Die 39 herunterregulierten Gene haben u.a. bekannte Funktionen im Rahmen des mRNA-Splicings und des zellulären Transports.

**Tabelle 19. Transkripte mit herunterregulierter Expression in den revertierten Brustkrebsproben
(im Vergleich zu den nicht-revertierten Brustkrebsproben)**

Affymetrix Probenet	Gensymbol	Fold Change (revertiert/ nicht-revertiert)	Genname
216167_at	LRRN2	-11,23	leucine rich repeat neuronal 2
226086_at	SYT13	-9,98	synaptotagmin XIII
228010_at	PPP2R2C	-7,29	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, gamma iso- form
223574_x_at	PPP2R2C	-5,65	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, gamma iso- form
223822_at	SUSD4	-5,63	sushi domain containing 4
228943_at	MAP6	-5,62	microtubule-associated protein 6
211273_s_at	TBX1	-5,2	T-box 1
219425_at	SULT4A1	-4,7	sulfotransferase family 4A, member 1
241352_at	NA	-4,32	NA
243105_at	NA	-4,27	NA
206696_at	GPR143	-4,08	G protein-coupled receptor 143
234709_at	CAPN13	-3,95	calpain 13
1557044_at	NA	-3,89	NA
205473_at	ATP6V1B1	-3,83	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1
1554159_a_at	ZMYND11	-3,76	zinc finger, MYND domain containing 11
1552801_at	CAPN13	-3,75	calpain 13
1562226_at	VWDE	-3,61	von Willebrand factor D and EGF domains
239739_at	SNX24	-3,58	sorting nexin 24
227933_at	LINGO1	-3,55	leucine rich repeat and Ig domain containing 1
205154_at	LRRN2	-3,5	leucine rich repeat neuronal 2
211205_x_at	PIP5K1A	-3,45	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha
213562_s_at	SQLE	-3,45	squalene epoxidase
1554887_at	NA	-3,44	NA
216855_s_at	HNRNPU	-3,36	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)
230423_at	NA	-3,34	NA
243857_at	MORF4L2	-3,3	Mrgx mRNA for MRGX
216588_at	NA	-3,26	NA
223232_s_at	CGN	-3,24	cingulin
211427_s_at	KCNJ13	-3,11	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13
232309_at	NA	-3,11	NA
235447_at	TRUB1	-3,1	TruB pseudouridine (psi) synthase homolog 1 (E. coli)
215281_x_at	POGZ	-2,92	pogo transposable element with ZNF domain
1554575_a_at	BPNT1	-2,9	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1
215249_at	RPL35A	-2,85	ribosomal protein L35a
221926_s_at	IL17RC	-2,79	interleukin 17 receptor C
233001_at	SAMD10	-2,72	sterile alpha motif domain containing 10
223984_s_at	NUPL1	-2,71	nucleoporin like 1
242091_at	ZNF720	-2,7	zinc finger protein 720
206712_at	GRTP1	-2,66	growth hormone regulated TBC protein 1
211016_x_at	HSPA4	-2,66	heat shock 70kDa protein 4
1563524_a_at	NA	-2,65	NA

Fortsetzung Tabelle 19. Transkripte mit herunterregulierter Expression in den revertierten Brustkrebsproben

243588_at	NA	-2,58	NA
1565717_s_at	FUS	-2,54	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)
243219_x_at	NA	-2,51	NA
203441_s_at	CDH2	-2,49	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
209872_s_at	PKP3	-2,47	plakophilin 3
233248_at	NA	-2,4	NA
232466_at	CUL4A	-2,32	Homo sapiens, clone IMAGE:3893153, mRNA
213472_at	HNRNPH1	-2,26	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)

3.5 Validierung der Genexpressionsdaten

Sieben der differentiell exprimierten Gene wurden mittels qRT-PCR erfolgreich validiert (Abbildung 7). Drei Gene mit einer hochregulierten Expression in den revertierten Tumoren im Vergleich zu den nicht-revertierten Tumoren (ELF5, MUCL1, PIP) und vier Gene mit einer herunterregulierten Expression (MAP6, ZMYND11, LINGO1, SQLE) wurden hierfür verwendet. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient und ein anschließender t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurden benutzt, um die Korrelation zwischen den Affymetrix-Expressionsdaten und den qRT-PCR-Ergebnissen zu ermitteln. In zwei von sieben Fällen entsprachen die qRT-PCR-Daten denen der Genchips ($p \leq 0.029$). LINGO1, MAP6, ZMYND11, SQLE und ELF5 zeigten keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Affymetrix-Genchipwerten und den qRT-PCR-Werten. Obwohl nicht statistisch signifikant, entsprachen die qRT-PCR-Daten dieser beiden Gene dennoch den Ergebnissen der Genchips.

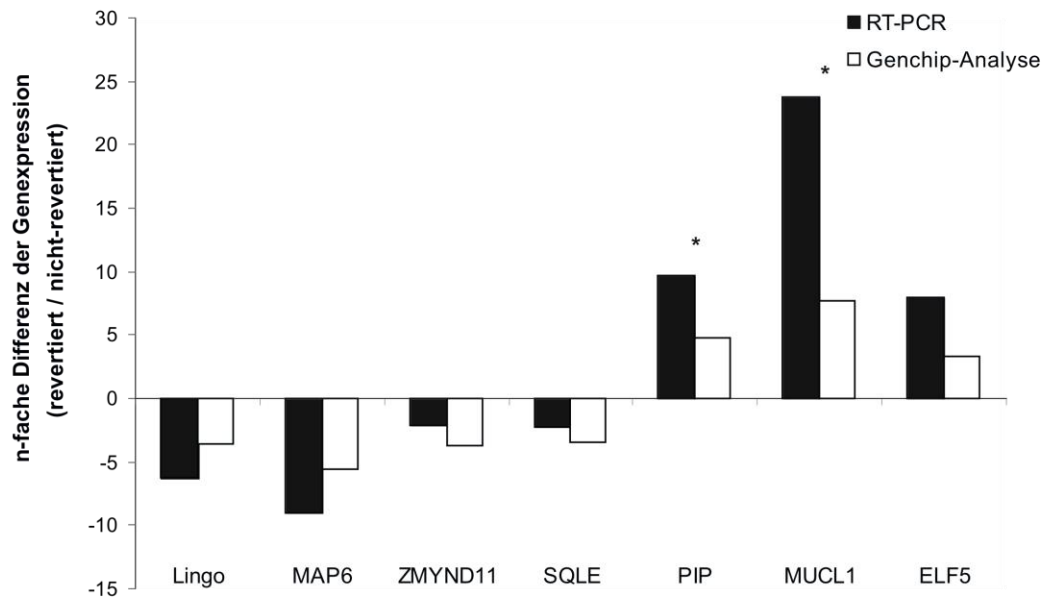


Abbildung 7. Validierung der mRNA-Level differentiell regulierter Gene durch qRT-PCR

Sieben differentiell exprimierte Gene wurden untersucht, um die Ergebnisse der Genchip-Analysen zu validieren. Die mRNA-Level von 7 Genen (3 Gene mit hochregulierter und 4 Gene mit herunterregulierter Expression in den revertierten im Vergleich zu den nicht-revertierten Tumoren) wurden von allen 10 Tumoren mittels qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als n-fache Differenz (*fold change*) zwischen den revertierten und den nicht-revertierten Tumoren dargestellt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert für das Gen in den 10 Brustkrebsproben. Die mit einem Stern versehenen Balkenpaare zeigen eine positive Korrelation zwischen den Daten der qRT-PCR und den Ergebnissen der Genchip-Analysen ($p \leq 0,002$).

4. Diskussion

Der maligne Phänotyp von primären Mammakarzinomzellen (PBC) war in 5 von 13 Fällen in der Cokultur mit normalen humanen Mammastromafibroblasten (HMF) revertierbar. Das Wachstumsmuster der PBC in den revertierten Cokulturen ähnelte dem der normalen Brustdrüse in vivo, während die gleichen PBC in der Monokultur ein invasionsähnliches, disseminiertes Wachstumsmuster zeigten. Außerdem konnte durch Analysen des Gesamtwachstums der PBC eine Wachstumsstimulation durch die Fibroblasten als Ursache für die Reversion ausgeschlossen werden. Die Revertierbarkeit der Tumore ließ sich nicht mit etablierten klinisch-pathologischen Markern assoziieren. Korrelierend mit dem Ergebnis der unterschiedlichen Revertierbarkeit der Tumore konnten Unterschiede in den Genexpressionsprofilen von revertierten und nicht-revertierten Tumoren festgestellt werden.

4.1 Wahl des Zellkulturmodells

Die Aufrechterhaltung der baso-apicalen Polarität innerhalb der Brustdrüse ist nicht nur Aufgabe des Mammaepithels. Ein Gleichgewicht zwischen Proliferations- und Apoptosesignalen sowie ein komplexes Zusammenspiel aus Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten entscheidet letztendlich über eine korrekte Differenzierung (Polyak und Kalluri, 2010). Veränderungen in einem dieser Prozesse stören die Gewebsarchitektur und ebnen den Weg für die Entstehung von Tumoren (Bissell et al., 2003). Um die Prozesse, die zu einer Reversion führen, identifizieren zu können, war es für die vorliegende Arbeit von entscheidender Bedeutung, ein Kulturmodell zu wählen, welches die Bedingungen in vivo bestmöglich widerspiegelt und gleichzeitig konstante Versuchsbedingungen bietet.

In zweidimensionalen Zellkulturmodellen wachsen die Zellen vornehmlich im Monolayer (Abbildung 2). Diese Modelle sind per definitionem also nicht in der Lage, die Bedingungen in vivo gut abzubilden. Außerdem können die Zellen in einer zweidimensionalen Kultur zwar als polar bezeichnet werden, aber diese Art der Polarisierung der Zellachse hat allerdings wenig mit der in einem dreidimensionalen Kulturmodell oder in vivo gemein (Bissell et al., 2003). Im Gegensatz zu zweidimensionalen Kulturen besitzen Brustepithelzellen in einem dreidimensionalen Kontext zahlreiche Eigenschaften des Mammaepithels in vivo. Unter anderem kommt es z.B. in Matrigel™ zur Bildung von wachstumsarretierten polarisierten Azini von normalen Mammaepithelien oder malignen Brustkrebszelllinien mit einem hohlen Lumen und der basalen Expression von Basalmembran-Komponenten wie Kollagen-IV und Laminin (Weigelt und Bissell, 2008). Aufgrund der genannten Vorteile wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein dreidimensionales Kulturmodell verwendet.

Der Annahme folgend, dass in einem definierten Stroma die reziproken Wechselwirkungen zwischen Epithel und Stroma entscheidend sind für die Differenzierung des Mammaepithels (s. 1.3 und 1.5), wurden in der vorliegenden Arbeit PBC in einer dreidimensionalen Matrix

aus Kollagen-I, sowohl als Mono- als auch als Cokultur mit normalen humanen Stroma-fibroblasten kultiviert. Dieses Modell erfüllte viele Eigenschaften der Brustdrüsenarchitektur in vivo.

Das Stroma macht knapp 80% des Brustvolumens aus und setzt sich aus Wachstumsfaktoren, der EZM und Stromazellen einschließlich Entzündungszellen, Endothelzellen und Fibroblasten zusammen (Drife, 1986). Bekannte Funktionen von Fibroblasten sind die Produktion der ECM und die Regulierung der Differenzierung der benachbarten Epithel (Chen et al., 2008; Krause et al., 2008). Durch die Zugabe der HMF in der Cokultur und der Verwendung von Kollagen-I als Matrix, auch in vivo ein Hauptbestandteil der interstitiellen Matrix (McCave et al., 2010), wurden die PBC mit einem normalisierten Stroma konfrontiert.

Im Vergleich zu Kollagen-I ist die Verwendung von Substraten, die aus EHS-Tumoren (Matrigel™ und Cultrex® BM) gewonnen wurden, nicht geeignet, um konstante Versuchsbedingungen zu schaffen. Sie werden durch Züchtung eines Tumors in Mäusen erzeugt und enthalten neben den Hauptbestandteilen wie Kollagen-IV und Laminin andere Proteine und Komponenten, die das Verhalten der Zelle beeinflussen können (Inman und Bissell, 2010). Somit kann die hier beschriebene Reversion von Zellen in einer HMF-Cokultur in Kollagen-I, im Vergleich zu einem Experiment in Matrigel™, nicht auf die bereits in der Matrix vorhandenen Substanzen zurückgeführt werden. Sie muss allein durch die Zugabe der HMF und den damit verbundenen Veränderungen entstanden sein. Das verwendete Modell ermöglicht es also, unter konstanten Versuchsbedingungen zu arbeiten und sukzessive die drei Variablen Matrix, PBC und HMF auf ihre Bedeutung für den Reversionsprozess hin zu untersuchen.

4.2 Herausforderungen in der Kultivierung der PBC

Die Früherkennungsmaßnahmen für das Mammakarzinom werden immer sensitiver. Brustkrebspatientinnen können häufiger bereits in frühen Stadien ihrer Erkrankung einer Therapie zugeführt werden (Chu et al., 1988; Connor et al., 1989; Ernst et al., 2002; Feinstein et al., 1985; Fracheboud et al., 2004; Krebsregisterdaten, 2012; Weaver, D. L. et al., 2006). Folglich sinkt dadurch der Anteil der Patientinnen mit großen oder symptomatischen Tumoren. Wie in Tabelle 16 (s. 3.1) gezeigt, wurden bis auf einen Fall nur PBC aus einem Tumor $\geq 1,5$ cm erfolgreich isoliert und kultiviert. Die Ausgangsgröße des Tumorgewebes, das für die Isolation zur Verfügung stand, war dabei entscheidend für die Menge der durch die Isolation gewonnenen Zellen. Zwar ist das Wachstumsverhalten der PBC in vitro interindividuell unterschiedlich; je mehr Zellen jedoch isoliert werden konnten, umso besser wuchsen die Zellen in den Kulturflaschen. Mit einer hohen Ausgangszellzahl konnte häufiger ein Wachstum in Zellverbänden (Zellinseln) erreicht werden, welches wiederum zu einem schnelleren Wachstum der Zellen führte. Wuchsen die PBC aufgrund einer geringeren Ausgangszellzahl einzeln, so stagnierte das Wachstum rasch.

Der Rückgang der Zahl der Patientinnen, bei denen ihre Erkrankung erst in einem späten Stadium diagnostiziert wurde, ist ein großer Fortschritt im Kampf gegen den Brustkrebs. Für die Forschung mit primären Zellen wirkt sich dies jedoch nachteilig auf das Bestreben aus, möglichst viele Zellen erfolgreich zu isolieren.

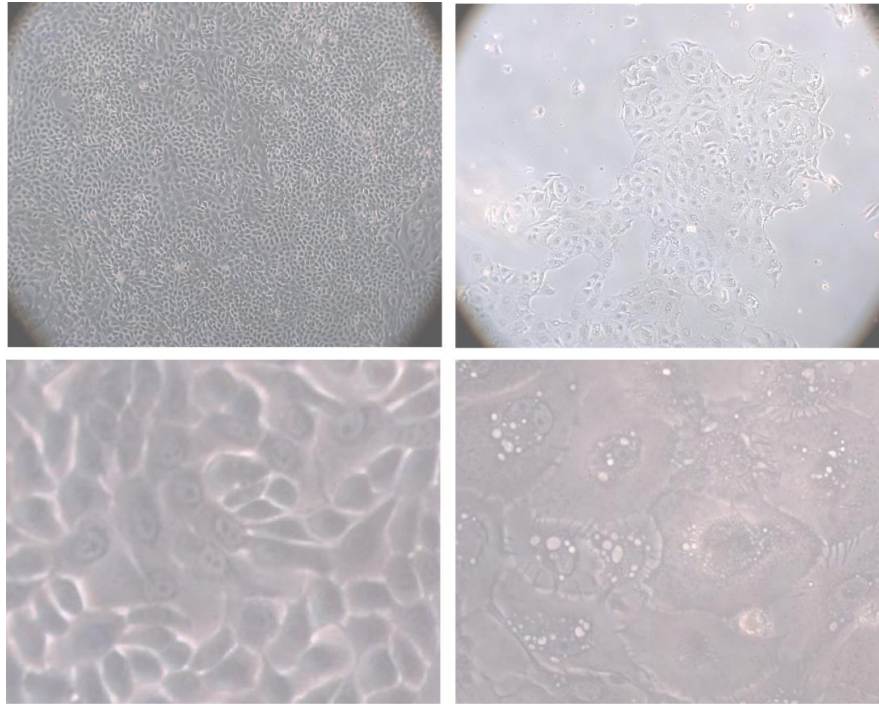


Abbildung 8. Wachstum der PBC in Kulturflaschen

Linke Spalte: vital aussehende Zellen. Rechte Spalte: alternde Zellen. Lichtmikroskopie, (obere Reihe: 10-fache Vergrößerung, untere Reihe: 25-fache Vergrößerung). In der oberen Reihe wachsen die vitalen PBC eng zusammen. Die einzelne Zelle ist dunkel. Im Rahmen des Alterungsprozesses (s. Bild rechts oben) lockern sich die Zellinseln auf, die Zellen erscheinen heller. In der unteren Reihe zeigen die Zellen rechts einen homogenen Zellkern, mit gut abgrenzbarem Nukleolus und einem verhältnismäßig schmalen Cytoplasmasaum. Die Zellen in der rechten Spalte zeigen zunehmend weiße Vakuolen intracytoplasmatisch, die Zellkerne nehmen an Größe zu und teilweise ist ein Nukleolus nicht mehr klar abgrenzbar.

Im Vergleich zu Zelllinien altern primäre Zellen ab dem Zeitpunkt der Präparate-Entnahme. Auch aus diesem Grund ist eine hohe Ausgangszellzahl wünschenswert, um die PBC nicht zu lange in der Kulturflasche kultivieren zu müssen. Zeigten die PBC schon in der Kulturflasche deutliche Zeichen der Zellalterung, war oftmals ein schlechteres Wachstum in der dreidimensionalen Zellkultur zu beobachten (

Abbildung 8). Um eine dreidimensionale Zellkultur anzusetzen, musste also der Zeitpunkt angepasst werden, an dem die Zellen eine ausreichende Zellzahl für eine Mono- und eine Cokultur erreicht hatten und gleichzeitig nicht zu alt waren, um auch in der dreidimensionalen Kultur noch weiter zu wachsen. Zudem war es schwierig, PBC länger als 10 Tage in der dreidimensionalen Matrix zu kultivieren. Nach dem siebten Kulturtag konnte oft ein Wachstumsarrest beobachtet werden und zusätzlich kontrahierten die HMF häufig das Gel, so

dass, um eine Auswertbarkeit der Gele zu ermöglichen, die Kulturen frühzeitig fixiert werden mussten.

4.3 Reversion des malignen Phänotyps

Die Einzelheiten des Prozesses, der zur Reversion des malignen Phänotyps der PBC durch die HMF führt, sind zwar noch weitgehend unentschlüsselt, aber in der Literatur gibt es viele Hinweise, dass es sich um ein komplexes Zusammenspiel aus Matrixbeschaffenheit (Gehler et al., 2009; Wozniak et al., 2003), Veränderung intrazellulärer und extrazellulärer Signalwegen (Joyce, 2005) sowie aus Sezernierung von biologisch aktiven Substanzen (Luhr et al., 2012) handelt.

In der vorliegenden Arbeit, formten die PBC in der Cokultur, umgeben von Fibroblasten, runde, azinus-ähnliche Zellcluster, in denen das Lumen von einem einschichtigen, polarisierten Epithel gebildet wurde. Als Zeichen ihrer Polarisierung exprimierten die PBC innerhalb der revertierten Zellcluster apical Golgiprotein, basal $\beta 1$ - und $\beta 4$ -Intergrin sowie β -Catenin im Bereich der Zell-Zell-Kontakte. Im Gegensatz dazu zeigten die gleichen PBC in der Monokultur ein invasionsähnliches Wachstumsmuster. Sie wuchsen disseminiert und formten lockere, längliche Zellaggregate, die meist aus wenigen Zellen bestanden. Außerdem bildeten die PBC in der Monokultur keine baso-apicale Polarität oder ein Lumen aus. Sie zeigten weder eine apikale Expression von Golgiproteinen noch eine basale Expression von Integrinen. Für beide Proteine konnte eine disseminierte, über alle Zellpole verteilte Expression nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte nur eine sehr geringe Expression von β -Catenin nachgewiesen werden. Da β -Catenin ein wichtiger Bestandteil der Adhärenskontakte s.u. in Epithelzellen ist (Lüllmann-Rauch, 2006), spricht eine geringe Expression von β -Catenin für eine mangelnde Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zwischen den PBC. Diese Beobachtung passt zu ihrem Wachstum in lockeren Zellaggregaten. Aus der Literatur ist bekannt, dass im Bereich der Adhärenskontakte von Epithelien eine Colokalisierung von e-Cadherin mit β -Catenin beobachtet werden kann (Lüllmann-Rauch, 2006). Eine geringere e-Cadherin Expression wird außerdem mit schlecht differenzierten Karzinomen assoziiert ist (Hagios et al., 1998). Dies zeigten auch Ergebnisse von Frixen et al., die eine inverse Korrelation von Invasivität mit der e-Cadherin Expression in den humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-36 feststellten (Frixen et al., 1991). Es wäre zu erwarten, dass die PBC in der Monokultur entsprechend ihrer β -Catenin-Expression eine geringere e-Cadherin Expression zeigen und in der Cokultur eine Colokalisierung von e-Cadherin und β -Catenin im Bereich der Adhärenskontakte stattfindet. Dies wäre ein weiteres Merkmal für das Wiedererlangen einer Differenzierung der PBC in der Cokultur mit HMF. Eine e-Cadherin Färbung gelang aus methodischen Gründen in der vorliegenden Arbeit leider nicht, es wäre aber erstrebenswert, bei weiteren Versuchen mit PBC eine e-Cadherin-Färbung durchzuführen.

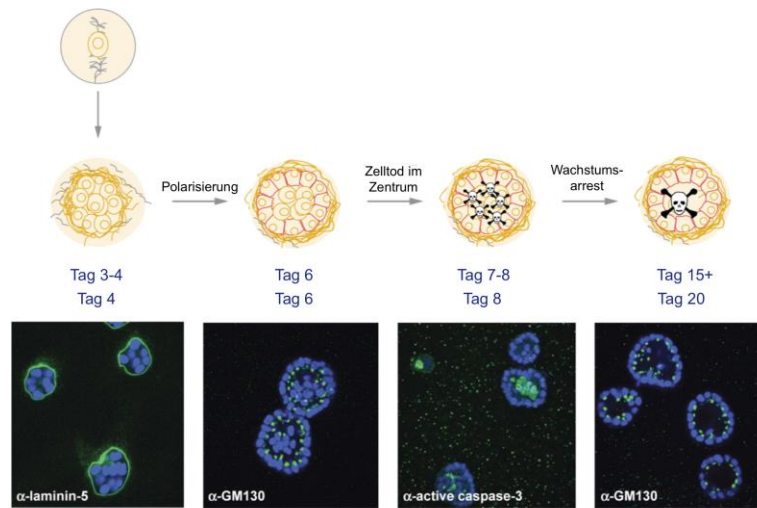


Abbildung 9. Lumenformierung durch Polarisation und Apoptose am Beispiel der humanen Brustzelllinie MCF-10A

Oben: schematische Darstellung der Entstehung eines Azinus mit zentralem Lumen in einer dreidimensionalen Matrix aus Matrigel™. Unten: Immunhistochemisches Korrelat. α -Laminin-5 wurde als basaler und α -GM130 (Golgin) als apikaler Differenzierungsmarker verwendet. Die unpolarisierten Zellen im Zentrum des Lumens wurden apoptotisch, erkenntlich durch die Expression von α -active caspase-3, und hinterließen ein hohles Lumen. Bild modifiziert nach (Debnath et al., 2002; Hebner et al., 2008).

Krause et al. kultivierten die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 für 6 Wochen in Kollagen-I oder Mischgelen aus Kollagen-I und Matrigel™ sowohl als Mono- als auch als Cokultur mit HMF. Passend zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen formten auch die MCF-7 in der Monokultur eher lockere, unpolarisierte Zellcluster, während für die MCF-7 in den Kollagen-I-Cokulturen nach zwei Wochen eine baso-apicale Polarisation nachgewiesen werden konnten. Nach sechs Wochen konnte in diesen Kulturen ein Lumen, entstanden durch Apoptose im Zentrum, nachgewiesen werden (Krause et al., 2010). Analog zu den Ergebnissen von Krause et al. konnte in dieser Arbeit in Cokultur mit den HMF eine Lumenformierung beobachtet werden, obwohl die Zellen im Vergleich zu den MCF-7 nur für 9-10 Tage in Kollagen-I kultiviert wurden. Laut Hebner et al. ist die baso-apicale Ausrichtung der Zellachse die wichtigste Voraussetzung für die Entstehung eines Lumens, erst danach werden die Zellen im Zentrum des entstandenen Azinus apoptotisch (Hebner et al., 2008) (Abbildung 9). Neben der Expression der bereits genannten und durch Immunfluoreszenz nachgewiesenen Differenzierungsmarker ist die Formierung eines Lumens also ein weiteres Zeichen für die phänotypische Reversion der PBC durch den Einfluss der HMF in der Cokultur. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings nicht eindeutig differenziert werden, ob die Ausbildung eines Lumens durch die baso-apicale Ausrichtung der Zellachse und/oder durch Apoptose in der Mitte des Azinus entstanden war (Debnath et al., 2002; Hebner et al., 2008; Ojakian et al., 1997). Aufschluss hierüber könnten *timecourse*-Experimente liefern. Hierbei werden mehrere identische Kulturen am gleichen Tag gestartet, aber an verschiedenen Tagen fixiert. So wäre es möglich, die Veränderungen der Zellaggregate in Abhängigkeit der Länge ihrer Kultivierung zu beurteilen und zu identifizieren, wann und wo die Ausbildung eines Lumens beginnt.

Diese waren aufgrund der genannten Wachstumseigenschaften der PBC allerdings nicht durchführbar (s. 4.2).

4.4 Interindividuelle Unterschiede in der Revertierbarkeit von PBC

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der maligne Phänotyp von primären Brustkrebszellen in der Tat durch Cokultivierung mit Fibroblasten revertierbar ist. Interessanterweise war es aber nicht möglich, eine Revertierbarkeit der Zellen anhand klinisch-pathologischer Parameter vorherzusagen.

Dass Fibroblasten den malignen Phänotyp von Brustkrebszellen in der Zellkultur revertieren können, wird auch von anderen Arbeiten bestätigt (Krause et al., 2010; Luhr et al., 2012). Allerdings wird durch neuere Arbeiten auch deutlich, dass eine Reversion mehr von interindividuellen Unterschieden als von den cokultivierten Zellen selbst abhängig ist. So konnten Lühr et al. zeigen, dass die Revertierbarkeit von Epithelzellen unabhängig vom Fibroblasten-Typ ist (Luhr et al., 2012). Durch Cokultivierung der benignen humanen Mammaepithelzelllinie HMT-3522 (S1) mit NF, CAF und HMF konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Reversion der S1-Zellen um einen HMF-spezifischen Effekt handelte. Alle drei Fibroblasten-Typen induzierten eine Reversion der S1-Zellen. Interessanterweise konnte kein Unterschied im Bezug auf das Wachstum oder die Differenzierung der S1-Zellen in Cokultur mit NF oder CAF gefunden werden. Beide primären Fibroblasten-Typen waren gleichermaßen in der Lage, eine Differenzierung der S1-Zellen zu induzieren. Übereinstimmend zeigten auch Sadlonova et al., dass das Wachstum der humanen Brustkrebszelllinie MCF10A in Matrigel™ sowohl von NF als auch von CAF gehemmt wird (Sadlonova et al., 2005). Im Gegensatz dazu, konnten Su et al. für die humane Brustkrebszelllinie T47D-Zellen in Cokultur mit CAF eine höhere Wachstumsstimulation als mit NF nachweisen (Su et al., 2012). Sie stellen die Hypothese auf, dass CAF von *high grade* Tumoren einen größeren Variabilitätsverlust im Bezug auf die Produktion von löslichen Faktoren und der Beeinflussung des Wachstums von Tumorzellen haben, als CAF von *low grade* Tumoren oder NF. Je bösartiger der Ausgangstumor, umso uniformer sind die Wirkungen der CAF auf die T47D-Zellen. Auch Sadlonova et al. konnten für die primären NF und CAF eine interindividuelle Variabilität im Bezug auf ihre Fähigkeit das Wachstum der MCF10A-Zellen zu inhibieren nachweisen, auch wenn dies aufgrund eines zu kleinen Kollektivs nicht eindeutig bewiesen wurden (Sadlonova et al., 2005). Zusätzlich weisen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit auch deutlich auf interindividuelle Unterschiede hin. Die Tumoren lassen sich klar in ein revertierbares und ein nicht-revertierbares Kollektiv einteilen, obwohl es durch keinen Parameter möglich war, die Revertierbarkeit der Tumoren vorherzusagen.

Dies legt den Schluss nahe, dass die Reversion ein Zusammenspiel aus der Reversions-Bereitschaft einer Epithelzelle und dem allgemeinen Einfluss der Fibroblasten, z.B. auf die mechanischen und biochemischen Eigenschaften der Matrix (s. 4.5.2), ist.

Leider war es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, PBC in Cokultur mit NF oder CAF zu kultivieren. Für die Isolierung der PBC stand nur eine begrenzte Anzahl OP-Präparate zur Verfügung und wie unter 4.2 erwähnt, war die Kultivierung sehr anspruchsvoll, sodass die erwähnten Versuche nicht im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt werden konnten. Sie sind allerdings Gegenstand zukünftiger Versuche unserer Arbeitsgruppe.

4.5 Bedeutung der Fibroblasten im Reversionsprozess

4.5.1 Einfluss der von Fibroblasten sezernierten löslichen Faktoren

Bestandteile der Basalmembran wie Laminin, Nidogen-1 und Kollagen-IV sind essentiell für die Differenzierung des Mammaepithels (Lelièvre SA, 2005; Pujuguet et al., 2000). Allerdings wurden für die Experimente in Mono- und Cokultur ausschließlich Kollagen-I und H14-Medium ohne Zusatz von den oben genannten Basalmembranbestandteilen verwendet. Der entscheidende Unterschied zwischen der Mono- und Cokultur liegt allein in der Zugabe der HMF. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, bilden die PBC in der Monokultur im Vergleich zur Cokultur mit HMF so gut wie nie differenzierten Azini aus. Die alleinige Zugabe dieses zweiten Zelltyps zu einer Kultur aus primären Mammakarzinomzellen führt also zu einer Reversion.

Weiterführende Experimente unserer Arbeitsgruppe bestätigten durch Überstandsanalysen des HMF-Mediums, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fibroblasten Nidogen-1, Kollagen-IV und Laminin produzieren (Luhr et al., 2012). Auch andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass Stromafibroblasten aus verschiedenen Geweben in der Lage sind, Komponenten der Basalmembran zu produzieren (Fleischmajer et al., 1995; Lam et al., 2004; Ohshima et al., 2003). Pujuguet et al. konnten anhand des Expressionslevels des Mammaepithel-Differenzierungsmarkers β -Casein nachweisen, dass alle drei genannten Komponenten (Nidogen-1, Kollagen-IV, Laminin) essentiell sind für die Differenzierung. Nidogen-1 stellt hierbei die Verbindung zwischen Laminin-1 und Kollagen-IV dar. Die alleinige Zugabe von Nidogen-1 zu einer Kultur aus Epithelzellen war - im Vergleich zu Laminin-1, nicht in der Lage, eine Expression von β -Casein zu induzieren. Durch die Zugabe von Laminin-1 konnte eine leichte β -Casein-Expression nachgewiesen werden. Die stärkste β -Casein-Expression konnte aber erst mit einer Kombination aus Nidogen-1 und Laminin induziert werden. Wurde ein Nidogen-1 Fragment ohne Kollagen-IV Bindungsstelle benutzt, konnte eine erhebliche Reduktion der β -Casein-Expression nachgewiesen werden (Pujuguet et al., 2000).

In der Cokultur zeigten die PBC eine basale Expression von β 1- und β 4-Integrin. Integrine stellen die Verbindung zwischen einer Zelle und der umgebenden Basalmembran dar (s. 1.2) (Lüllmann-Rauch, 2006). Es ist somit naheliegend zu vermuten, dass die HMF die Formie-

rung einer den Azinus umgebenden Basalmembran durch Sezernierung von Basalmembranbestandteilen induziert haben. Es wurde versucht, Basalmembranbestandteile an den vorliegenden Kulturen durch Immunfluoreszenz nachzuweisen. Da jedoch die verwendeten Antikörper gegen Kollagen-IV, Nidogen-1 und Laminin keine ausreichende Penetranz der Gele erreichten und das Material der dreidimensionalen Kulturen deutlich begrenzt war, konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Optimierungen der Färbemethoden unternommen werden. Die Färbung von Basalmembrankomponenten ist jedoch ein interessanter Aspekt für weitergehende Forschungsprojekte.

4.5.2 Einfluss der Fibroblasten auf die Matrixcompliance

Neben löslichen Faktoren beeinflusst auch die mechanische Eigenschaft des Stromas das Verhalten und die Differenzierung der Zellen (Alcaraz et al., 2008; Guo et al., 2006; Luhr et al., 2012; Paszek et al., 2005). Das den Tumor umgebende Gewebe wird durch die desmoplastische Stromareaktion fibrotisch umgebaut (Böcker et al., 2008). Prämaligne Läsionen sind etwa 3 - 6 mal fester als das weiche und fettreiche Gewebe der gesunden Brustdrüse, duktale Karzinome mit einem hohen Kernmalignitätsgrad sind sogar bis zu 13-mal fester (Lopez et al., 2008; Samani et al., 2007). Außerdem weiß man, dass die Prognose von Patientinnen mit Tumoren, die in ihrer Umgebung eine starke Fibrose induziert haben, schlechter ist als die von Patientinnen mit vergleichbar weichem Bindegewebe (Colpaert et al., 2001).

Auch in vitro konnten die beschriebenen Verhältnisse in vivo nachvollzogen werden. Roeder et al. zeigten, dass einer Erhöhung der Kollagenkonzentrationen zu einer Erhöhung der Festigkeit einer Kollagen-Matrix in vitro führt (Roeder et al., 2002). Im Zellkulturmodell konnte man so die Festigkeit der Matrix durch Erhöhung oder Erniedrigung der Kollagenkonzentration variieren und das Verhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Matrixbeschaffenheit untersuchen.

Zellen der nicht tumorigenen Mammaepithelzelllinie MCF10A wuchsen umso differenzierter, desto weicher die sie umgebende Matrix war (Paszek et al., 2005). In Kollagengelen mit einer hohen Gelfestigkeit konnte keine Lumenbildung mehr beobachtet werden, Marker für Basalmembran und Zell-Zell-Kontakte wurden nur noch diffus exprimiert. Wozniak et al. zeigten analog zu den vorherigen Ergebnissen, dass MCF10A-Zellen in Kollagengelen mit hoher Gelfestigkeit undifferenziert wuchsen. Interessanterweise konnten sie aber für MCF10A Zellen in Kollagengelen, die vom Rand der Kulturplatte abgelöst wurden (*floating*), eine Ausbildung von azinus-ähnlichen Strukturen beobachten (Wozniak et al., 2003). Die MCF10A Zellen waren darüber hinaus in der Lage, die *floating*-Gele zu kontrahieren (Wozniak et al., 2003). Aus der Literatur ist bekannt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Zelldifferenzierung und der Fähigkeit einer Zelle, die sie umgebene Matrix zu kontrahieren, gibt. So konnten Gehler et al. zeigten, dass eine Differenzierung von Zellen in Gelen mit hoher Festigkeit ausblieb, da sie nicht in der Lage waren, die Matrix zu kontrahieren (Gehler et al.,

2009). Sie vermuten einen Filamin A- β 1-Integrin abhängigen Signalweg, der es Zellen ermöglicht, die Matrixkonsistenz wahrzunehmen und gleichzeitig die Kontraktilität des Zytoskeletts daran anzupassen. Lühr et al. konnten übereinstimmend eine Filamin A-Produktion für die HMF nachweisen (Lühr et al., 2012). Außerdem zeigten sie, dass die humane Mamma-Epithelzelllinie S1 in Abhängigkeit von der Matrixfestigkeit verschiedene Wachstumseigenschaften zeigte. S1-Zellen in Kulturen geringer Festigkeit wuchsen azinus-ähnlich, wohingegen sie in Kulturen mit hoher Festigkeit krebsähnlich wuchsen. Interessanterweise ließ sich aber ein azinus-ähnliches Wachstum für die S1-Zellen in Cokultur mit HMF für Kulturen mit hoher Festigkeit beobachten. Die Fibroblasten waren wahrscheinlich in der Lage, die Störungen in der Gewebshömostase zu beseitigen. Im Kontrast zu den Ergebnissen von Wozniak et al. differenzieren S1-Zellen in einer *floating* Monokultur nicht. In den *floating*-Kulturen war nur durch Zugabe von HMF eine Differenzierung zu erreichen.

Analog zu den genannten Ergebnissen konnte auch für die PBC-Monokultur ein ähnliches Verhalten nachgewiesen werden. PBC differenzierten erst in Anwesenheit von HMF in der Matrix. Es ist wahrscheinlich, dass die PBC, ähnlich wie die S1-Zellen, nicht in der Lage sind, die Matrixbeschaffenheit durch die Kontraktion der Kollagengele zu beeinflussen. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Monokulturen nicht kontrahierten. Die Möglichkeit einer Filamin A-Produktion durch die PBC wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Im Gegensatz zur Monokultur und übereinstimmend mit den Ergebnissen der Überstandsanalysen von Lühr et al., kontrahierten die Cokulturgele innerhalb der 10-tägigen Kulturdauer häufig.

PBC in der Monokultur waren zudem wahrscheinlich einer anderen Gelspannung ausgesetzt als die Zellen in der Cokultur. Durch die Kultivierung zwei verschiedener Zelltypen wurde in der Cokultur ($0,15 \times 10^6/\mu\text{l}$) eine höhere Zellzahl verwendet als in der Monokultur ($0,05 \times 10^6/\mu\text{l}$). Analog dazu konnte mehrfach beobachtet werden, dass die Mono- und Cokulturgele oftmals nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank unterschiedliche Konsistenzen aufwiesen. Auch mit der Phasenkontrastmikroskopie erschienen die Monokulturgele transparenter. Diese Beobachtungen passen zu Ergebnissen von Larsen et al.. Sie stellen die Hypothese auf, dass die Fähigkeit einer Zelle zur Umgestaltung der sie umgebenden Matrix durch ein Gleichgewicht zwischen Steifigkeit der Matrix und Zellkontraktilität erwächst (Larsen et al., 2006).

Die Differenzierung der PBC in Abhängigkeit von den HMF in der Cokultur lässt sich wahrscheinlich auf mehrere lösliche und Matrix modulierende Faktoren zurückführen. Die Cokultur-Matrix zeigte im Vergleich zur Monokultur eine veränderte Konsistenz durch die Zugabe der HMF. Die HMF haben wahrscheinlich durch ihre kontraktilen Eigenschaften das Gel in der Weise moduliert, dass sie die auf die PBC wirkende Spannung senken und somit eine Differenzierung ermöglichen.

4.6 Molekulargenetische Ursachen für die Reversion des malignen Phänotyps

Der Prozess der Reversion entsteht durch eine Vielzahl komplexer Signalwege, Sezernierung löslicher Faktoren durch Fibroblasten, Veränderungen in der Matrix-Konsistenz und Induktion zellulärer Integrin-Signalwege. Da aber keine Assoziation zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und der Revertierbarkeit eines Tumors gefunden werden konnte, ist anzunehmen, dass der Reversionsprozess trotz der genannten involvierten zellulären Interaktionen zu einem gewissen Anteil ein individueller Prozess ist (s. 4.4). Dies könnte auch ein Grund für die verhältnismäßig geringen Reversionsraten sein. Die PBC werden zwar durch die HMF mit einem normalisierten Stroma konfrontiert, aber die Individualität der primären Zellen kann augenscheinlich auch dadurch nicht vollständig dominiert werden.

Es ist bereits bekannt, dass die Entstehung von polarisierten epithelialen Geweben ein dynamischer Prozess ist, der über reziproke Signalkaskaden zwischen dem *microenvironment* und dem Genom letztlich zu einer Veränderung der Genexpression führt (Bissell et al., 1982). Dieser Erkenntnis folgend wurde eine Erklärung für den Reversionsprozess auch auf molekularer Ebene gesucht.

Betrachtet man die Liste der differentiell exprimierten Gene, so sind vor allem die Funktionen von zwei Genen mit hochregulierter Expression (MAL, ELF5) und von drei Genen mit herunterregulierter Expression (MAP6, ZMYND11, SQLE) interessant für den Reversionsprozess. MAL wurde erstmals durch die Erforschung der differentiellen Genexpression während der T-Zellentwicklung entdeckt (Alonso und Weissman, 1987). MAL wird häufig in sezernierenden, polarisierten Epithelien exprimiert (Marazuela et al., 2003) und ist verantwortlich für die Entstehung und den Transport apikaler Transportvesikel (Martin-Belmonte et al., 2001; Martin-Belmonte et al., 2000). Darüber hinaus ist es involviert in der cervikalen Karzinogenese (Overmeer et al., 2009) und zeigt in einer Vielzahl epithelialer Tumoren, darunter das Ösophaguskarzinom und das Kolonkarzinom, eine herunterregulierte Expression (Mimori et al., 2003; Mori et al., 2006). Dies passt zu dem Ergebnis, dass MAL in revertierten, also phänotypisch normalen PBC eine hochregulierte Expression zeigt. Ergebnisse von Horne et al. sind ebenfalls konkordant mit dem Expressionsmuster von MAL in den PBC. Sie konnten zeigen, dass der MAL Promotor in Brustkrebszelllinien (MCF7, MDA-MB468, ZR75-1, BT474, HCC1937) und in primären Brustkrebszellen hypermethyliert ist (Horne et al., 2009). Da die RNA vor der Kultivierung der PBC gewonnen wurde, wäre es an dieser Stelle interessant zu wissen, ob die Induktion einer Reversion die Expressionslevel von MAL weiter erhöht hätte. Bezogen auf die Prognose von Patientinnen mit Brustkrebs konnte durch Tissue-Microarray-Analysen gezeigt werden, dass Patientinnen mit fehlender MAL-Expression ein kürzeres krankheitsfreies Überleben hatten als entsprechende Patientinnen mit normaler MAL-Expression (Horne et al., 2009).

ELF5 ist ein epithelialer Transkriptionsfaktor. Er ist ein Hauptregulator sowohl der Entwicklung als auch der Differenzierung des Mammaepithels (Siegel und Muller, 2010). In Mäusen ist die ELF5-Expression ausschließlich im luminalen Mammaepithel nachweisbar und entscheidend für die Entwicklung der laktierenden Mamma. Darüber hinaus versterben ELF5-knock-out Mäuse in frühen Stadien der Embryogenese (Zhou et al., 2005). Choi et al. zeigten, dass Epithelzellen aus der Mamma in ELF5-knock-out Mäusen nicht differenzierten (Choi et al., 2009), während Harris et al. durch retrovirale Reexpression von ELF5 in Mammaepithelien die Entstehung von Brustdrüsengewebe reinduzieren konnte (Harris et al., 2006). Passend dazu konnten Ma et al. zeigen, dass ELF5 in Brustkrebsgewebe im Vergleich zu normalem Brustdrüsengewebe eine herunterregulierte Expression zeigt (Ma et al., 2003). Somit spricht eine hochregulierte Expression von ELF5, genauso wie von MAL, wahrscheinlich für eine größere Bereitschaft der PBC zu revertieren. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Sotgia et al, die einen gewissen Schutz gegen Brustkrebs durch Überexpression von ELF5 vermuten (Sotgia et al., 2009), ist es naheliegend, dass es Tumore gibt, die durch ihr spezifisches Genexpressionmuster eine bessere Revertierbarkeit zeigen, unabhängig von den Kulturbedingungen. Außerdem könnten diese Patientinnen einer Kohorte mit einem längeren Überleben angehören. Zum einen kann die Revertierbarkeit getestet werden, indem man PBC nur aus den Geweben von Frauen kultiviert, die nachweislich z.B. ELF5 und MAL exprimieren, und der Einfluss auf die Prognose könnte durch immunhistochemische Färbungen an Tissue-Microarrays nachvollzogen werden.

Unter den Genen mit herunterregulierter Expression in den revertierten im Vergleich zu den nicht revertierten Tumoren sind die folgenden Gene von besonderem Interesse.

MAP6 oder STOP (stable tubule-only polypeptide) ist ein Calmodulin-reguliertes Protein, das die Stabilität von Mikrotubuli über die Bindung an Tubulin abhängig von seinen Phosphorylierungsgrad reguliert (Avila et al., 1994; Denarier et al., 1998). In Mantelzelllymphomen erfolgt eine MAP6-Amplifikation mit Fortschreiten der Erkrankung (Vater et al., 2009). Dies konnte für die PBC nicht nachvollzogen werden, da wie unter 4.2 erwähnt, die Zellen nahezu ausschließlich aus Tumoren im fortgeschrittenen Stadium isoliert wurden und MAP6 trotzdem in den revertierten Tumorproben eine herunterregulierte Expression zeigte. Galmarini et al. konnten zeigen, dass p53 wahrscheinlich die Transkription von MAP6 negativ reguliert (Galmarini et al., 2003). Da viele Tumorzellen eine p53-Mutation in sich tragen, würde dies bedeuten, dass in den Zellen, die niedrige MAP6-Level haben, mehr p53 exprimiert wird. Dies ist übereinstimmend mit den hier vorliegenden Ergebnissen, denn eine herunterregulierte Expression von MAP6 und dadurch eine vermehrte Expression von p53 würde wahrscheinlich mit einem weniger aggressiven Wachstumsmuster einhergehen und somit ebenfalls eine bessere Reversionsbereitschaft bedingen.

ZMYND-11, auch BS69 genannt, ist ein Zinkfingerprotein, das durch seine Fähigkeit, das Adenovirus E1A-Protein zu binden und seine Funktion zu supprimieren, entdeckt wurde (Hateboer et al., 1995). Zhang et al. haben bewiesen, dass ZMYND-11 ein integrale Bestandteil der Zellalterung ist (Zhang et al., 2007). Knockdown von ZMYND-11 in primären Fibroblasten führte zum Zellzyklusarrest. Die herunterregulierte Expression von ZMYND-11 in den revertierten Tumorproben kann also mit einem differenzierten und für Apoptosesignale sensibleren Wachstumsmuster einhergehen.

In der Sterolsynthese katalysiert SQLE den ersten Oxidationsschritt von Squalen zu S-Squalen-2,3-epoxid und ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 lokalisiert (Nagai et al., 1997). Helms et al. zeigten, dass SQLE in Tumoren mit einem Zugewinn am kurzen Arm von Chromosom 7 und am langen Arm von Chromosom 8 vermehrt exprimiert wurde und dass diese hochregulierte Expression eine Gruppe von Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebspatientinnen im Frühstadium identifiziert, die ein erhöhtes Metastasenrisiko und somit eine schlechtere Prognose haben (Helms et al., 2008).

Durch die molekulargenetische Untersuchung der Tumorproben, aus denen die PBC für die Kulturen gewonnen wurden, wird klar, dass der Reversionsprozess in der Tat eine individuelle Komponente hat. Zwar wird die Individualität durch die Normalisierung des Stromas zu einem großen Teil überdeckt, aber sie lässt sich durch die hier angewendeten Kulturbedingungen nicht vollständig dominieren. Es wäre hilfreich, für zukünftige Experimente eine Genexpressionanalyse vor und nach der Kultivierung in dem dreidimensionalen Cokulturmodell durchzuführen, um einen direkten Vergleich zwischen den durch die Reversion erfolgten phänotypischen und molekularen Veränderungen zu schaffen.

4.7 Bewertung und Ausblick

Es konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass der maligne Phänotyp von primären Brustkrebszellen in einer dreidimensionalen Matrix, die frei von Basalmembranbestandteilen ist, allein durch die Zugabe von normalen, humanen Mammastromafibroblasten revertierbar ist. Die Revertierbarkeit der Karzinome war unabhängig von etablierten klinisch-pathologischen Tumorcharakteristika und zeigte interindividuelle Unterschiede. Passen dazu konnten Unterschiede im Genexpressionsprofil zwischen revertierbaren und nicht-revertierbaren Tumorproben gefunden werden.

Durch Veränderungen im *microenvironment* können das Wachstumsverhalten, die Differenzierungsmuster und wahrscheinlich auch intrazelluläre Signalwege einer Zelle beeinflusst werden. Obwohl sich in den letzten Jahren unser Verständnis über Epithel-Stroma-Interaktionen verbessert hat, besteht dringender Bedarf, die Funktion der Stromafibroblasten in malignen Geweben systematisch und noch umfassender zu charakterisieren. Außerdem gilt es, den Signalweg zu finden, der unabhängig von interindividuellen Unterschieden dauerhaft und wiederholt eine Reversion des malignen Phänotyps induzieren kann. Gelingt es, die nachteiligen Interaktionen zwischen Stromazellen und Karzinomzellen durch Normalisierung des Tumorstromas gezielt zu unterbinden, wird das *tumormicroenvironment* ein innovatives therapeutisches Target in der Therapie des Mammakarzinoms darstellen.

5. Zusammenfassung

Maligne Tumoren sind als Organsysteme zu verstehen, in denen wechselseitige Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem umgebenden Stroma stattfinden. Die Stromazellen können dabei aktiv an Invasion und Progression eines Tumors teilnehmen. Umgekehrt konnte jedoch auch gezeigt werden, dass durch Manipulation des Tumorstromas eine Reversion des malignen Phänotyps beim Mammakarzinom induziert werden kann.

Primäre Mammakarzinomzellen (PBC) wurden aus den OP-Präparaten von 13 invasiven Mammakarzinomen isoliert und in einer dreidimensionalen Kollagen-I-Matrix sowohl als Mono- als auch als Cokultur mit normalen humanen Mammastromafibroblasten (HMF) kultiviert. Nach 9-10 Tagen wurden das Wachstum und die Differenzierung der Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung evaluiert. Eine Reversion wurde definiert als die Ausbildung von drüsenähnlichen Azini mit polarisierter Ausrichtung der Zellachse und strukturiertem Wachstum durch die Tumorzellen in der Cokultur im Vergleich zur Monokultur. Die Polarität wurde bewiesen durch die apikale Expression von Golgin und die basale Expression von $\beta 4$ - und $\beta 1$ -Integrin. Außerdem wurde die Expression von β -catenin, ZO-1 und Vimentin untersucht. Die molekulare Signatur von insgesamt 5 revertierten und 5 nicht-revertierten Karzinomen wurde durch eine globale Expressionanalyse mittels DNA-microarray-Analyse (Affymetrix HG-U133 Plus 2.0) ermittelt. Durch qRT-PCR Analyse wurden die Arrayergebnisse validiert.

Für fünf der dreizehn Cokulturen (38%) konnte im Vergleich zur Monokultur eine Reversion des malignen Phänotyps nachgewiesen werden ($p \leq 0,02$). Es zeigte sich in den revertierten Kulturen eine baso-apicale Polarisierung der Zellachse sowie eine ausgeprägte Ähnlichkeit des Wachstumsmusters der PBC mit der Gewebearchitektur der normalen Brustdrüse. Zusätzlich exprimierten die PBC als weiteren Differenzierungsmarker am apicalen Zellpol ZO-1 und als Zeichen der Etablierung von Zell-Zell-Kontakten am lateralen Zellpol β -catenin.

Im Gegensatz dazu konnte in der Monokultur ein invasives und unstrukturiertes Wachstum beobachtet werden, das durch eine diffuse Lokalisation der Differenzierungsmarker $\beta 4$ -Integrin, $\beta 1$ -Integrin, Golgin-97 und ZO-1 gekennzeichnet war. Eine diffuse Expression von β -Catenin bewies die Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte. Ein ähnliches Wachstumsverhalten war auch für die PBC in den nicht-revertierten Cokulturen nachweisbar. Interessanterweise war in den revertierten Cokulturen eine Vimentinexpression ausschließlich in den HMF nachweisbar während in den Monokulturen auch PBC diesen mesenchymalen Marker exprimierten.

Da die Reversion weder mit etablierten klinisch-pathologischen Marker assoziiert werden noch ein wachstumsstimulierender Effekt der HMF als möglicher Mechanismus der Reversionsreaktion bestätigt werden konnte, wurden die Zellen auf molekularer Ebene weiter cha-

rakterisiert. Zur Identifizierung der molekularen Signatur der revertierten und nicht revertierten Karzinome wurden Genexpressionsprofile erstellt. Im Vergleich zu den nicht-revertierten zeigten in den revertierten Tumorproben 42 Transkripte mit bekannten Funktionen in Bereichen der Zelladhäsion, der Signaltransduktion und der Transkription eine hochregulierte Expression. 49 Transkripte mit u.a. bekannten Funktionen im Rahmen des mRNA-Splittings und des zellulären Transports zeigten in den revertierten Proben eine herunterregulierte Expression. Sieben der differentiell exprimierten Gene wurden mittels qRT-PCR validiert.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Reversion des malignen Phänotyps primärer Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von normalen humanen Mammastromafibroblasten in der Cokultur konnte ein phänotypisch benignes Wachstum der PBC in einer dreidimensionalen Matrix aus Kollagen-I induziert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die gleichen Karzinomzellen in der Monokultur weiterhin ein invasives und undifferenziertes Wachstum. Im Kontrast zur aktuellen Literatur wurden die Cokultur-Experimente in dieser Arbeit erstmalig mit primären Tumorzellen an Stelle von Tumorzelllinien durchgeführt. Zusammen mit den hier gewonnen Ergebnissen könnten weitere Untersuchungen dazu führen, die genauen molekularen Mechanismen einer Reversion zu identifizieren und Strategien zur Normalisierung des Tumorstromas zu entwickeln. Das dreidimensionale Cokulturmodell stellt hierbei einen neuen, vielversprechenden Ansatz dar, um die verschiedenen Bestandteile des Reversionsprozesses weiter zu charakterisieren. Insgesamt stellt die Normalisierung des Stromas einen innovativen therapeutischen Ansatz in der Therapie des Mammakarzinoms dar.

6. Literaturverzeichnis

Adriance, M. C. , Inman, J. L., et al. (2005): Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. Breast Cancer Res, 7, 190-197

Alcaraz, J. , Xu, R., et al. (2008): Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. Embo J, 27, 2829-2838

Allinen, M. , Beroukhim, R., et al. (2004): Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. Cancer Cell, 6, 17-32

Alonso, M. A. Weissman, S. M. (1987): cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A, 84, 1997-2001

Arendt, L. M. , Rudnick, J. A., et al. (2010): Stroma in breast development and disease. Semin Cell Dev Biol, 21, 11-18

Avila, J. , Dominguez, J., et al. (1994): Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. Int J Dev Biol, 38, 13-25

Bauer, M. , Su, G., et al. (2010): 3D microchannel co-culture: method and biological validation. Integr Biol (Camb), 2, 371-378

BDBiosciences. from http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/doc/manuals/live/web_enabled/-356234_Guidelines.pdf.

Bertz, J. (2010): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 ; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI. Robert-Koch-Inst., Berlin

Bhowmick, N. A. , Neilson, E. G., et al. (2004): Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. Nature, 432, 332-337

Bissell, M. J. Bilder, D. (2003): Polarity determination in breast tissue: desmosomal adhesion, myoepithelial cells, and laminin 1. Breast Cancer Res, 5, 117-119

Bissell, M. J. , Hall, H. G., et al. (1982): How does the extracellular matrix direct gene expression? J Theor Biol, 99, 31-68

Bissell, M. J. Hines, W. C. (2011): Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. Nat Med, 17, 320-329

Bissell, M. J. Radisky, D. (2001): Putting tumours in context. Nat Rev Cancer, 1, 46-54

- Bissell, M. J. , Rizki, A., et al. (2003): Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. Current opinion in cell biology, 15, 753-762
- Blaschke, R. J. , Howlett, A. R., et al. (1994): Cell differentiation by extracellular matrix components. Methods Enzymol, 245, 535-556
- Böcker, W. , Heitz, P. U., et al. (2008): Pathologie. Mit über 200 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch; www.studentconsult.de]. (4., vollst. überarb. Aufl.), Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.]
- Briand, P., Lykkesfeldt, A. E. (2001): An in vitro model of human breast carcinogenesis: epigenetic aspects. Breast cancer research and treatment, 65, 179-187
- Briand, P. , Nielsen, K. V., et al. (1996): Trisomy 7p and malignant transformation of human breast epithelial cells following epidermal growth factor withdrawal. Cancer Res, 56, 2039-2044
- Charité. "Microarrayanalysis." from <http://www.charite.de/molbiol/bioinf/tumbiol/Microarrayanalysis-/Software/index.html>.
- Chen, S. T. , Pan, T. L., et al. (2008): Breast tumor microenvironment: proteomics highlights the treatments targeting secretome. J Proteome Res, 7, 1379-1387
- Choi, Y. S. , Chakrabarti, R., et al. (2009): Elf5 conditional knockout mice reveal its role as a master regulator in mammary alveolar development: failure of Stat5 activation and functional differentiation in the absence of Elf5. Dev Biol, 329, 227-241
- Chu, K. C. , Smart, C. R., et al. (1988): Analysis of breast cancer mortality and stage distribution by age for the Health Insurance Plan clinical trial. J Natl Cancer Inst, 80, 1125-1132
- Colpaert, C. , Vermeulen, P., et al. (2001): The presence of a fibrotic focus is an independent predictor of early metastasis in lymph node-negative breast cancer patients. Am J Surg Pathol, 25, 1557-1558
- Connor, R. J. , Chu, K. C., et al. (1989): Stage-shift cancer screening model. J Clin Epidemiol, 42, 1083-1095
- Debnath, J., Brugge, J. S. (2005): Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. Nat Rev Cancer, 5, 675-688
- Debnath, J. , Mills, K. R., et al. (2002): The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. Cell, 111, 29-40
- Denarier, E. , Aguezoul, M., et al. (1998): Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6). Biochem Biophys Res Commun, 243, 791-796
- Deutschland, S. B. (2011): Pressemitteilung Nr.048 vom 03.02.2011.

- Drife, J. O. (1986): Breast development in puberty. Ann N Y Acad Sci, 464, 58-65
- Erickson, A. C.Barcellos-Hoff, M. H. (2003): The not-so innocent bystander: the microenvironment as a therapeutic target in cancer. Expert Opin Ther Targets, 7, 71-88
- Ernst, M. F. , Roukema, J. A., et al. (2002): Breast cancers found by screening: earlier detection, lower malignant potential or both? Breast Cancer Res Treat, 76, 19-25
- Feinstein, A. R. , Sosin, D. M., et al. (1985): The Will Rogers phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer. N Engl J Med, 312, 1604-1608
- Fleischmajer, R. , Schechter, A., et al. (1995): Skin fibroblasts are the only source of nidogen during early basal lamina formation in vitro. J Invest Dermatol, 105, 597-601
- Fracheboud, J. , Otto, S. J., et al. (2004): Decreased rates of advanced breast cancer due to mammography screening in The Netherlands. Br J Cancer, 91, 861-867
- Frixen, U. H. , Behrens, J., et al. (1991): E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. J Cell Biol, 113, 173-185
- Galmarini, C. M. , Kamath, K., et al. (2003): Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. Br J Cancer, 88, 1793-1799
- Gehler, S. , Baldassarre, M., et al. (2009): Filamin A-beta1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension. Molecular biology of the cell, 20, 3224-3238
- Gudjonsson, T. , Ronnov-Jessen, L., et al. (2002): Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. J Cell Sci, 115, 39-50
- Guo, W. H. , Frey, M. T., et al. (2006): Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. Biophys J, 90, 2213-2220
- Hagios, C. , Lochter, A., et al. (1998): Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 353, 857-870
- Hanahan, D.Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144, 646-674
- Harris, J. , Stanford, P. M., et al. (2006): Socs2 and elf5 mediate prolactin-induced mammary gland development. Mol Endocrinol, 20, 1177-1187
- Hateboer, G. , Gennissen, A., et al. (1995): BS69, a novel adenovirus E1A-associated protein that inhibits E1A transactivation. Embo J, 14, 3159-3169

- Hebner, C. , Weaver, V. M., et al. (2008): Modeling morphogenesis and oncogenesis in three-dimensional breast epithelial cultures. Annu Rev Pathol, 3, 313-339
- Helms, M. W. , Kemming, D., et al. (2008): Squalene epoxidase, located on chromosome 8q24.1, is upregulated in 8q+ breast cancer and indicates poor clinical outcome in stage I and II disease. Br J Cancer, 99, 774-780
- Holliday, D. L. , Brouillette, K. T., et al. (2009): Novel multicellular organotypic models of normal and malignant breast: tools for dissecting the role of the microenvironment in breast cancer progression. Breast Cancer Res, 11, R3
- Horne, H. N. , Lee, P. S., et al. (2009): Inactivation of the MAL gene in breast cancer is a common event that predicts benefit from adjuvant chemotherapy. Mol Cancer Res, 7, 199-209
- Hu, M. , Yao, J., et al. (2005): Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. Nat Genet, 37, 899-905
- Hu, M. , Yao, J., et al. (2008): Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. Cancer Cell, 13, 394-406
- Inman, J. L. Bissell, M. J. (2010): Apical polarity in three-dimensional culture systems: where to now? J Biol, 9, 2
- Jones, J. C. (2008): Reduction of contamination of epithelial cultures by fibroblasts. CSH Protoc, 2008, pdb prot4478
- Joyce, J. A. (2005): Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. Cancer Cell, 7, 513-520
- Kalluri, R. Zeisberg, M. (2006): Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer, 6, 392-401
- Klein, A. , Guhl, E., et al. (2005): Gene expression profiling: cell cycle deregulation and aneuploidy do not cause breast cancer formation in WAP-SVT/t transgenic animals. J Mol Med (Berl), 83, 362-376
- Kleinman, H. K. , McGarvey, M. L., et al. (1986): Basement membrane complexes with biological activity. Biochemistry, 25, 312-318
- Kleinman, H. K. , McGarvey, M. L., et al. (1982): Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. Biochemistry, 21, 6188-6193
- Krause, S. , Maffini, M. V., et al. (2008): A novel 3D in vitro culture model to study stromal-epithelial interactions in the mammary gland. Tissue Eng Part C Methods, 14, 261-271
- Krause, S. , Maffini, M. V., et al. (2010): The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures. BMC Cancer, 10, 263

Krebsregisterdaten, Z. f. (2012): Krebs in Deutschland - Brustkrebs: epidemiologische Maßzahlen, Zentrum für Krebsregisterdaten 64-67.

Kreienberg, R. , Kopp, I., et al. (2008): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Deutschen Krebsgesellschaft e.V., (2. Auflage), Zuckschwerdt, Germering bei München

Kuperwasser, C. , Chavarria, T., et al. (2004): Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 4966-4971

Lam, S. , van der Geest, R. N., et al. (2004): Secretion of collagen type IV by human renal fibroblasts is increased by high glucose via a TGF-beta-independent pathway. Nephrol Dial Transplant, 19, 1694-1701

Larsen, M. , Artym, V. V., et al. (2006): The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. Curr Opin Cell Biol, 18, 463-471

Lee, G. Y. , Kenny, P. A., et al. (2007): Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. Nat Methods, 4, 359-365

Lelièvre SA, B. M. (2005): Three-dimensional cell culture: The importance of context in regulation of function. In: M. RA, Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 14, 383-420, Wiley-VCH, Weinheim

Li, M. L. , Aggeler, J., et al. (1987): Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 84, 136-140

Lopez, J. I. , Mouw, J. K., et al. (2008): Biomechanical regulation of cell orientation and fate. Oncogene, 27, 6981-6993

Luhr, I. , Friedl, A., et al. (2012): Mammary fibroblasts regulate morphogenesis of normal and tumorigenic breast epithelial cells by mechanical and paracrine signals. Cancer Lett, 325, 175-188

Lüllmann-Rauch, R. (2006): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. (2., komplett überarb. Aufl.), Thieme, Stuttgart [u.a.]

Ma, X. J. , Salunga, R., et al. (2003): Gene expression profiles of human breast cancer progression. Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 5974-5979

Marazuela, M. , Acevedo, A., et al. (2003): Expression of MAL, an integral protein component of the machinery for raft-mediated pical transport, in human epithelia. J Histochem Cytochem, 51, 665-674

Martin-Belmonte, F. , Arvan, P., et al. (2001): MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. J Biol Chem, 276, 49337-49342

Martin-Belmonte, F. , Puertollano, R., et al. (2000): The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines. Mol Biol Cell, 11, 2033-2045

Matrisian, L. M. , Cunha, G. R., et al. (2001): Epithelial-stromal interactions and tumor progression: meeting summary and future directions. Cancer Res, 61, 3844-3846

McCave, E. J. , Cass, C. A., et al. (2010): The normal microenvironment directs mammary gland development. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 15, 291-299

McGuire, P. G. Seeds, N. W. (1989): The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. J Cell Biochem, 40, 215-227

Mimori, K. , Shiraishi, T., et al. (2003): MAL gene expression in esophageal cancer suppresses motility, invasion and tumorigenicity and enhances apoptosis through the Fas pathway. Oncogene, 22, 3463-3471

Mori, Y. , Cai, K., et al. (2006): A genome-wide search identifies epigenetic silencing of somatostatin, tachykinin-1, and 5 other genes in colon cancer. Gastroenterology, 131, 797-808

Nagai, M. , Sakakibara, J., et al. (1997): Localization of the squalene epoxidase gene (SQLE) to human chromosome region 8q24.1. Genomics, 44, 141-143

Nelson, C. M. Bissell, M. J. (2005): Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. Semin Cancer Biol, 15, 342-352

Nelson, C. M. Bissell, M. J. (2006): Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol, 22, 287-309

Ohshima, M. , Tokunaga, K., et al. (2003): Laminin- and fibronectin-like molecules produced by periodontal ligament fibroblasts under serum-free culture are potent chemoattractants for gingival epithelial cells. J Periodontal Res, 38, 175-181

Ojakian, G. K. , Nelson, W. J., et al. (1997): Mechanisms for de novo biogenesis of an apical membrane compartment in groups of simple epithelial cells surrounded by extracellular matrix. J Cell Sci, 110 (Pt 22), 2781-2794

Olumi, A. F. , Grossfeld, G. D., et al. (1999): Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. Cancer Res, 59, 5002-5011

Overmeer, R. M. , Henken, F. E., et al. (2009): Repression of MAL tumour suppressor activity by promoter methylation during cervical carcinogenesis. J Pathol, 219, 327-336

- Paget, S. (1989): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer Metastasis Rev, 8, 98-101
- Paszek, M. J. , Zahir, N., et al. (2005): Tensional homeostasis and the malignant phenotype. Cancer Cell, 8, 241-254
- Plachot, C. , Chaboub, L. S., et al. (2009): Factors necessary to produce basoapical polarity in human glandular epithelium formed in conventional and high-throughput three-dimensional culture: example of the breast epithelium. BMC Biol, 7, 77
- Polyak, K.Kalluri, R. (2010): The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2, a003244
- Pujuguet, P. , Simian, M., et al. (2000): Nidogen-1 regulates laminin-1-dependent mammary-specific gene expression. J Cell Sci, 113 (Pt 5), 849-858
- Roeder, B. A. , Kokini, K., et al. (2002): Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. J Biomech Eng, 124, 214-222
- Ronnov-Jessen, L. , Petersen, O. W., et al. (1996): Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. Physiol Rev, 76, 69-125
- Rossi, L. , Reverberi, D., et al. (2000): Co-culture with human fibroblasts increases the radiosensitivity of MCF-7 mammary carcinoma cells in collagen gels. Int J Cancer, 85, 667-673
- Sadlonova, A. , Novak, Z., et al. (2005): Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture. Breast Cancer Res, 7, R46-59
- Samani, A. , Zubovits, J., et al. (2007): Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: an inversion-technique-based investigation of 169 samples. Phys Med Biol, 52, 1565-1576
- Sandal, T. , Valyi-Nagy, K., et al. (2007): Epigenetic reversion of breast carcinoma phenotype is accompanied by changes in DNA sequestration as measured by AluI restriction enzyme. Am J Pathol, 170, 1739-1749
- Shekhar, M. P. , Werdell, J., et al. (2001): Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. Cancer Res, 61, 1320-1326
- Siegel, P. M.Muller, W. J. (2010): Transcription factor regulatory networks in mammary epithelial development and tumorigenesis. Oncogene, 29, 2753-2759
- Sotgia, F. , Casimiro, M. C., et al. (2009): Loss of caveolin-3 induces a lactogenic microenvironment that is protective against mammary tumor formation. Am J Pathol, 174, 613-629

- Su, G. , Blaine, S. A., et al. (2007): Shedding of syndecan-1 by stromal fibroblasts stimulates human breast cancer cell proliferation via FGF2 activation. The Journal of biological chemistry, 282, 14906-14915
- Su, G. , Sung, K. E., et al. (2012): Functional screen of paracrine signals in breast carcinoma fibroblasts. PLoS One, 7, e46685
- Thiery, J. P. (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer, 2, 442-454
- Vater, I. , Wagner, F., et al. (2009): GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma. Br J Haematol, 144, 317-331
- Vukicevic, S. , Kleinman, H. K., et al. (1992): Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. Exp Cell Res, 202, 1-8
- Wang, F. , Hansen, R. K., et al. (2002): Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. J Natl Cancer Inst, 94, 1494-1503
- Wang, X. , Sun, L., et al. (2010): A complex 3D human tissue culture system based on mammary stromal cells and silk scaffolds for modeling breast morphogenesis and function. Biomaterials, 31, 3920-3929
- Watson, C. J.Khaled, W. T. (2008): Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. Development, 135, 995-1003
- Weaver, D. L. , Rosenberg, R. D., et al. (2006): Pathologic findings from the Breast Cancer Surveillance Consortium: population-based outcomes in women undergoing biopsy after screening mammography. Cancer, 106, 732-742
- Weaver, V. M. , Petersen, O. W., et al. (1997): Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. J Cell Biol, 137, 231-245
- Weigelt, B.Bissell, M. J. (2008): Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. Semin Cancer Biol, 18, 311-321
- Wessel, R. , Foos, V., et al. (2006): CorrXpression--identification of significant groups of genes and experiments by means of correspondence analysis and ratio analysis. In Silico Biol, 6, 61-70
- Wiseman, B. S.Werb, Z. (2002): Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. Science, 296, 1046-1049

Wozniak, M. A. , Desai, R., et al. (2003): ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. J Cell Biol, 163, 583-595

Xu, R. , Boudreau, A., et al. (2009): Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices. Cancer Metastasis Rev, 28, 167-176

Yamada, K. M.Cukierman, E. (2007): Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. Cell, 130, 601-610

Zhang, W. , Chan, H. M., et al. (2007): BS69 is involved in cellular senescence through the p53-p21Cip1 pathway. EMBO Rep, 8, 952-958

Zhou, J. , Chehab, R., et al. (2005): Elf5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation. Embo J, 24, 635-644

7. Anhang

7.1 Zusage Ethikkommission

MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL		 A.D. 1665
ETHIK-KOMMISSION		
<div>Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe 30. JAN. 2008</div> <div>Dr. med. H. Eidmann</div>		Schwanenweg 20 D-24105 Kiel Telefon 04 31 / 597-18 09 Telefax 04 31 / 597-18 31
Universitäts-Kinderklinik - Schwanenweg 20 - 24105 Kiel		Datum: 22.01.2008
Herr Prof. Dr. Dr. Walter Jonat Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel Michaelisstr. 16 24105 Kiel		<div>Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe 23. JAN. 2008</div> <div>Prof. Dr. med. W. Jonat</div>
AZ: D 400/08	(bitte stets angeben)	
Studienplan:	Reversion des malignen Phänotyps beim Mammakarzinom durch Stromafaktoren	
Antragsteller:	Antrag, Patienteninformation und Einverständniserklärung Prof. Dr. med. Dr. h. c. Walter Jonat, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel	
Datum des Antrages:	15.01.2008 (Eingang 18.1.2008)	
<p>Lieber Herr Jonat,</p> <p>vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.</p> <p>Es wird darauf hingewiesen, daß künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.</p> <p>Mit freundlichen kollegialen Grüßen</p> <div> Prof. Dr. med. Jürgen Schaub Vorsitzender der Ethik-Kommission</div> <div> Dr. med. Christine Glinicke Geschäftsführung der Ethik-Kommission</div>		

7.2 Einverständniserklärung



UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein
Campus Kiel, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Brunswiker Str. 10, 24105 Kiel

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein



Campus Kiel

Hausanschrift: Michaelisstr. 16

Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Jonat

Telefon (Pforte): 0431 / 597-2100/01

Durchwahl: 0431 / 597-

Fax: 0431 / 597-1247

E-Mail: jonat@email.uni-kiel.de

Name der Patientin:

Geburtsdatum der Patientin:

Einverständniserklärung

Ich bin damit einverstanden, dass aus einem Anteil einer Gewebeprobe, die zur Sicherung der Diagnose oder im Rahmen der operativen Therapie entnommen wird, zusätzlich auch wissenschaftliche Untersuchungen durchgeführt werden. Hierzu erfolgt **keine zusätzliche** Gewebeentnahme.

Folgende Untersuchung soll aus den Proben durchgeführt werden:

**„Reversion des malignen Phänotyps beim Mammakarzinom durch Stromafaktoren“
(Umwandlung von Brustkrebszellen in normales Brustdrüsengewebe durch Kontakt mit normalen gesunden Stromazellen)**

Die wissenschaftlichen Untersuchungen dienen der Erforschung von Krankheiten und werden zum Wohle der Patienten durchgeführt. Wenn gewünscht, werden mir die Ergebnisse dieser Untersuchungen jederzeit mitgeteilt.

Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein
Anstalt des
öffentlichen Rechts

Vorstandsmitglieder:
Prof. Dr. Bernd Kremer,
Dipl.-Kfm. Günter Zwilling,
Dipl.-Kff. (FH) Barbara Schulte

Bankverbindungen:
Fördesparkasse Kiel, Kto.-Nr. 100206, BLZ
21050170
Dresdner Bank Lübeck
Kto.-Nr. 300041200, BLZ 23080040
Steuer-Nr.: 19 293-88291



Spendenkonto: Krebsforschung an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe – Deutsche Bank, Kto.-Nr. 8720815 (BLZ 230 70710) unter Angabe des Verwendungszweckes „F 370485“



Ansonsten werden die Proben ohne direkten Bezug zu meiner Person aufbewahrt. Dies gilt auch für die Speicherung gewonnener Daten.

Ich wurde über dieses Vorgehen von _____ (Ärztin/Arzt) informiert und aufgeklärt. Das Einverständnis erfolgt freiwillig. Ich habe keine Nachteile, wenn ich es nicht abgebe. Es kann jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen werden. In diesem Fall werden noch nicht pseudonymisierte Proben oder Daten zu meiner Person gelöscht.

- ☐ Ich wünsche eine schriftliche Benachrichtigung über die Forschungsergebnisse.
- ☐ Ich wünsche **keine** schriftliche Benachrichtigung über die Forschungsergebnisse.

Kiel, den

Unterschrift Patientin

Unterschrift Ärztin/Arzt

7.3 Isolierungen

Tabelle 1. Probenherkunft

Proben ID Dissertation	Proben ID Liste Isolierungen	Reversion
1	10	+
2	17	+
3	28	+
4	32	+
5	68	+
6	13	-
7	16	-
8	34	-
9	35	-
10	49	-
11	31	-
12	19	-
13	67	-

Tabelle 2. Liste aller Isolierungen

ID	Co-Kultur angesetzt	Probenart	Histol. Subtyp	Tumorstadium (T)	Lymphknoten status (N)	Grading (G)	ER/PR	Her2+
1	ja	pr. Abl. li.	invasiv-dukta	pT2, pTis (DCIS)	pN2a(5/12)	G3	12/0	2
2	nein	Seg. re	invasiv-lobulär	pT2	pN0 (0/26)	G2	8/2	1
3	ja	Abl.re.	Inbrustre. re.	pT2	pN0 (0/10)	G3	12/3	3
4	nein	Seg. re.	invasiv-dukta	pT1c	pN1a(1/23)	G2	12/12	0
5	nein	pr. Abl.li.	invasiv-lobulär	pT2	pN3a(19/25)	G3	12/4	1
6	nein	pr.Abl.re.	invasiv-dukta	ypT2	ypN0 (0/28)	G3	1/0	2
7	ja	Abl.li.	invasiv-dukta	ypT1c	ypN2a(9/13)	G2	12/6	2
8	nein	sek. Abl.li.	DCIS	pTis (DCIS)	entfällt	G2	12/12	x
9	nein	Abl.li.	invasiv-dukta	rpT2	-	G2	12/12	0
10	ja	Tumorex. li.	invasiv-dukta	pT4b	-	G3	12/2	0
11	nein	Seg.li.	invasiv-lobulär	pT2	pN2a (8/19)	G2	12/8	0
12	nein	pr.Abl.li.	invasiv-dukta	pT2	pN1a (1/24)	G2	12/1	neg.
13	ja	Abl.li.	invasiv-dukta	pT2	pN1mic (1/19)	G2	12/12	0
14	ja	Abl.re.	invasiv-dukta	pT3, pTis	pN0 (0/32)	G2	12/9	0
15	ja	Seg.li., SLN	invasiv-lobulär	pT1c	pNSLN0 (0/2)	G2	12/0	1
16	ja	Seg.li.	invasiv-dukta	pT1c	pN1a (1/24 LK)	G3	0/0	0
17	ja	Tumorex. re.	ductulo-lobulär	pT4b	-	G2	12/6	neg.
18	nein	pr.Abl. bds.	multifokal, invasiv-dukta	pT2	pN2a (9/19)	G2	12/8	0
19	ja	Seg.re., SLN	invasiv-dukta	pT1c	pN0 (0/4)	G3	8/6	1

Fortsetzung Tabelle 2. Liste aller Isolierungen

20	nein	Seg.re., SLN	invasiv-dukta	pT2	pNSLN0 (0/2)	G1	12/12	0
21	nein	Seg.li.	invasiv-dukta	pT2, pTis (DCIS)	pN2a (7/20)	G2	12/12	0
22	nein	Seg.re., SLN	invasiv-dukta	pT2, pTis (DCIS)	pN1a (2/38)	G2	12/12	0
23	nein	Abl.re.	invasiv-dukta, multizentr.	pT3, pTis	pN1a (1/11)	G2	12/12	0
24	nein	Seg.li., SLN	invasiv-lobulär, neuroendokrin	pT2	pN0 (0/11)	G3	12/12	0
25	nein	Seg.li., SLN	invasiv-dukta	pT2	pNSLN0(0/2)	G2	12/9	0
26	nein	Seg.re., SLN	invasiv-dukta	pT2, pTis (DCIS)	pNSLN0(0/1)	G3	8/2	0
27	nein	Abl.li., SLN	invasiv-lobulär	pT3	pN0SLN(0/2)	G2	8/2	0
28	ja	Abl.li., SLN	invasiv-dukta	pT1c, pTis (DCIS)	pN0SLN(0/4)	G3	6/0	3
29	nein	Seg.re., SLN	invasiv-dukta	pT1c, pTIS (DCIS)	pNSLN0(0/3)	G2	6/0	0
30	ja	Seg.li., SLN	invasiv-dukta	pT2, pTis	pNSLN 0 (0/4)	G3	12/12	3
31	nein	pr.Abl.li., SLN	invasiv-lobulär	pT1c (m), pTis	pNSLN0(0/6)	G2	9/4	0
32	ja	pr.Abl.li., SLN	multizentr, invasiv-dukta	pT1b, pTis (DCIS)	pN 0 (0/2,sn)	G1	6/6	1
33	nein	pr.Abl. re., SLN	invasiv- muzinös, neu- roendokrin	pT2	pNSLN0 (0/6)	G2	12/12	0
34	ja	pr.Abl.li.	bifokal, invasiv- dukta	pT4b, pTis (DCIS)	N2a (8/10)	G2	12/8	0
35	ja	Seg.li., SLN	invasiv-lobulär	pT2, pTis	pNSLN 0 (0/5)	G2	12/9	0
36	nein	Seg.re., SLN	invasiv-lobulär	pT2, pTis	pNSLN0(0/3)	G2	12/8	0
37	nein	Seg.li., SLN	invasiv-lobulär	pT1c	pN2a (7/26)	G2	0/0	0
38	ja	Abl.re.	invasiv-dukta	pT3	pN3a (12/12)	G1	12/9	0
39	ja	Seg., SLN	invasiv-dukta	pT1c	pNSLN 0 (0/5)	G2	12/12	0
40	nein	Abla- tio/SLN	invasiv-lobulär	pT1c	pNSLN0(0/4)	G1	8/2	neg.
41	nein	Ablatio/ Axilla re.	invasiv-lobulär	pT1b	pN0 (0/18)	G2	8/2	3
42	nein	Segm./ Axilla li.	invasiv- muzinös	pT2	pN0 (0/11)	G2	12/8	neg.
43	nein	Segm. Re. /SLN	-	pT1c	pN0 (0/1, sn)	G2	12/12	0
44	nein	Segm./SL N li.	invasiv-dukta	pT1b	pN1 (1/3)	G3	0/0	Neg.
45	nein	Segm./SL N li.	invasiv-dukta	pT1b	pNSLN0(0/4)	G2	0/0	neg.
46	nein	Segm/SL N beid- seits Loki.	invasiv-dukta	links: pT1b, rechts: pT2	links: pN3 (39/41) rechts:pNSLN0 (0/2)	beidseits G3	12/12	links: 0, rechts: neg.
47	ja	Ablatio re.	invasiv-lobulär	pT3, LIN II	pN2a (8/17)	G2	12/6	neg.
48	nein	Segm. Links	invasiv-lobulär	pT2	pN0 (0/5, sn)	G2	12/12	0
49	ja	Ablatio li., SLN li.	multizentrisch	pT3	pNSLN 0 (0/7)	G2	12/12	0
50	nein	Ablatio re.	invasiv-dukta	pT2 (m)	pN1a (3/18),	G2	8/12	0
51	nein	Segm./SL N, re.	invasiv-dukta	pT2	pN(sn)0 (0/1),	G2	12/9	1
52	nein	Segm. li./SLN	invasiv-dukta	pT1c	pN0 (sn; OS- NA)(0/4)	G3	0/0	neg.

Fortsetzung Tabelle 2. Liste aller Isolierungen

53	ja	Segm./SL N li, SS, OSNA	invasiv-dukta	pT2, pTis	pN1a	G2	6/9	neg
54	ja	Segm./SL N, re.	Bifokal, invasiv- dukta	pT2 (m)	pN1a (1/4, sn)	G2	12/12	0
55	nein	Segm./SL N, li.	invasiv-dukta	pT1c, pTis	pN0 (0/3 sn, OSNA)	G2	12/12	neg.
56	nein	Segm./SL N, re.	invasiv-dukta	pT2	pN0 (0/1;sn)	G2	3/0	3+
57	ja	Segm. n. Loki links, Ablatio re., SLN, Axilla	invasiv-dukta	pT2 (m)	pN1a	G1	8/8	neg.
58	nein	Segm./SL N re, OSNA	invasiv-dukta	pT2	pN0 (sn; OS- NA)(0/4)	G3	12/9	0
59	nein	Segm. n. Loki li., Axilla	invasiv-dukta	pT1c, pTis (DCIS)	pN1a (1/17)	G2	12/12	neg.
60	nein	Segm. Re, SS, SLN	invasiv-lobulär	pT1c	pN0 (0/20)	G2	8/2	neg.
61	ja	Segm. li./SLN	invasiv-lobulär	pT2	pN0	G2	0/0	neg.
62	nein	Ablatio, SLN rechts	invasiv-dukta	pT2 (m)	pN0 (0/3;sn)	G3	8/3	neg.
63	nein	Segm. Re, SS, SLN, re.	invasiv-dukta	pT2	pN0 (0/2)	G3	2/0	neg.
64	nein	Segm. N. Loki., SLN rechts	invasiv-dukta	pT2, pTis	pN2a (4/22)	G2	12/9	neg.
65	ja	Qudran- tektomie links	invasiv-dukta	pT1c (m), (DCIS)	pTis pN0 (0/2 sn)	G2 und G3	12/0	3
66	nein	Ablatio	-	pT1b (m)	pN0 (0/1sn)	G2 und G3	0/0	0
67	nein	Ablatio links	-	pT2m, pTis	pN0 (0/13 sn)	G1	3/6	0
68	ja	prim. Ablatio li.	invasiv-dukta	pT1c(m), pTis	pN0 (0/24)	G3	8/4	2
69	nein	Segm. re, SS, SLN	invasiv-dukta	pT2	pNSLN0 (0/2)	G2	12/8	neg.

7.4 Auswertung der Mono- und Cokulturen

Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 1						
Ergebnis	t-Test	Typ 1: 0,52	Typ 2: 0,12	Typ 3: 0,00		
(Mono- vs. Cokultur)						
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	7	8,14	2	2,33	1	1,16
	6	6,98	1	1,16	0	0,00
	6	6,98	1	1,16	0	0,00
	2	2,33	1	1,16	0	0,00
	4	4,65	2	2,33	0	0,00
	1	1,16	2	2,33	0	0,00
	6	6,98	1	1,16	1	1,16
	0	0,00	2	2,33	0	0,00
	2	2,33	2	2,33	0	0,00
	9	10,47	2	2,33	1	1,16
	7	8,14	1	1,16	0	0,00
	3	3,49	2	2,33	0	0,00
	4	4,65	1	1,16	0	0,00
	2	2,33	3	3,49	1	1,16
Summe	59		23		4	
Prozent	68,60		26,74		4,65	
SD	2,67		0,63		0,47	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	3	3,95	1	1,32	1	1,32
	4	5,26	1	1,32	2	2,63
	7	9,21	1	1,32	2	2,63
	1	1,32	0	0,00	2	2,63
	3	3,95	1	1,32	0	0,00
	4	5,26	0	0,00	1	1,32
	4	5,26	0	0,00	1	1,32
	5	6,58	1	1,32	2	2,63
	3	3,95	2	2,63	1	1,32
	3	3,95	2	2,63	1	1,32
	2	2,63	1	1,32	1	1,32
	4	5,26	0	0,00	1	1,32
	1	1,32	3	3,95	0	0,00
	1	1,32	1	1,32	2	2,63
Summe	45		14		17	
Prozent	59,21		18,42		22,37	
SD	1,67		0,88		0,70	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 2						
Ergebnis t-Test (Mono- vs. Cokultur)	Typ 1: 0,82	Typ 2: 0,02	Typ 3: 0,01			
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	3	2,56	3	2,56	1	0,85
	4	3,42	6	5,13	1	0,85
	4	3,42	2	1,71	1	0,85
	9	7,69	1	0,85	2	1,71
	4	3,42	2	1,71	1	0,85
	5	4,27	3	2,56	2	1,71
	3	2,56	4	3,42	1	0,85
	4	3,42	0	0,00	1	0,85
	6	5,13	2	1,71	0	0,00
	4	3,42	2	1,71	1	0,85
	4	3,42	2	1,71	0	0,00
	3	2,56	4	3,42	1	0,85
	5	4,27	4	3,42	3	2,56
	6	5,13	2	1,71	1	0,85
Summe	64		37		16	117
Prozent	54,70		31,62		13,68	100,00
SD	1,60		1,50		0,77	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	1	0,88	1	0,88	2	1,77
	1	0,88	2	1,77	3	2,65
	9	7,96	0	0,00	2	1,77
	18	15,93	3	2,65	4	3,54
	5	4,42	1	0,88	2	1,77
	3	2,65	0	0,00	1	0,88
	2	1,77	0	0,00	1	0,88
	5	4,42	2	1,77	3	2,65
	1	0,88	1	0,88	2	1,77
	3	2,65	1	0,88	1	0,88
	2	1,77	2	1,77	2	1,77
	6	5,31	1	0,88	2	1,77
	3	2,65	2	1,77	2	1,77
	7	6,19	3	2,65	1	0,88
Summe	66		19		28	
Prozent	58,41		16,81		24,78	
SD	4,53		1,01		0,88	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 3						
Ergebnis t-Test (Mono- vs. Cokultur)	Typ 1: 0,37	Typ 2: 0,64	Typ 3: 0,00			
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	15	6,58	2	0,88	0	0,00
	12	5,26	3	1,32	0	0,00
	17	7,46	3	1,32	0	0,00
	27	11,84	2	0,88	0	0,00
	8	3,51	1	0,44	0	0,00
	16	7,02	4	1,75	0	0,00
	7	3,07	1	0,44	1	0,44
	14	6,14	1	0,44	0	0,00
	9	3,95	0	0,00	1	0,44
	20	8,77	1	0,44	0	0,00
	13	5,70	3	1,32	1	0,44
	18	7,89	1	0,44	0	0,00
	10	4,39	2	0,88	0	0,00
	13	5,70	1	0,44	1	0,44
Summe	199		25		4	
Prozent	87,28		10,96		1,75	
SD	5,31		1,12		0,47	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	11	11,58	0	0,00	1	1,05
	7	7,37	1	1,05	1	1,05
	7	7,37	1	1,05	1	1,05
	3	3,16	0	0,00	1	1,05
	5	5,26	1	1,05	1	1,05
	3	3,16	0	0,00	1	1,05
	4	4,21	2	2,11	1	1,05
	4	4,21	0	0,00	1	1,05
	2	2,11	2	2,11	0	0,00
	7	7,37	1	1,05	1	1,05
	5	5,26	1	1,05	3	3,16
	8	8,42	0	0,00	0	0,00
	4	4,21	2	2,11	0	0,00
	1	1,05	1	1,05	0	0,00
Summe	71		12		12	
Prozent	74,74		12,63		12,63	
SD	2,67		0,77		0,77	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 4						
Ergebnis t-Test (Mono- vs. Cokultur)	Typ 1: 0,40	Typ 2: 0,76	Typ 3: 0,02			
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	4	3,36	1	0,84	1	0,84
	4	3,36	2	1,68	1	0,84
	6	5,04	1	0,84	1	0,84
	4	3,36	1	0,84	1	0,84
	4	3,36	2	1,68	1	0,84
	3	2,52	0	0,00	1	0,84
	7	5,88	1	0,84	1	0,84
	7	5,88	1	0,84	2	1,68
	7	5,88	2	1,68	1	0,84
	1	0,84	2	1,68	1	0,84
	8	6,72	2	1,68	2	1,68
	11	9,24	4	3,36	1	0,84
	8	6,72	0	0,00	2	1,68
	4	3,36	4	3,36	2	1,68
Summe	78		23		18	
Prozent	65,55		19,33		15,13	
SD	2,59		1,22		0,47	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	3	2,42	1	0,81	3	2,42
	4	3,23	2	1,61	3	2,42
	1	0,81	1	0,81	2	1,61
	3	2,42	0	0,00	2	1,61
	3	2,42	1	0,81	3	2,42
	8	6,45	5	4,03	6	4,84
	7	5,65	1	0,81	2	1,61
	8	6,45	1	0,81	2	1,61
	7	5,65	2	1,61	2	1,61
	5	4,03	2	1,61	1	0,81
	5	4,03	2	1,61	2	1,61
	8	6,45	2	1,61	2	1,61
	5	4,03	1	0,81	1	0,81
	3	2,42	1	0,81	1	0,81
Summe	70		22		32	
Prozent	56,45		17,74		25,81	
SD	2,29		1,16		1,27	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 5						
Ergebnis t-Test (Mono- vs. Cokultur)	Typ 1: 0,57	Typ 2: 0,13	Typ 3: 0,00			
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	4	2,68	1	0,67	0	0,00
	13	8,72	0	0,00	1	0,67
	15	10,07	2	1,34	0	0,00
	11	7,38	2	1,34	1	0,67
	6	4,03	1	0,67	0	0,00
	10	6,71	0	0,00	1	0,67
	4	2,68	0	0,00	1	0,67
	5	3,36	0	0,00	1	0,67
	4	2,68	2	1,34	0	0,00
	7	4,70	1	0,67	0	0,00
	13	8,72	3	2,01	0	0,00
	3	2,01	1	0,67	0	0,00
	12	8,05	0	0,00	1	0,67
	3	2,01	1	0,67	1	0,67
Summe	110		14		7	
Prozent	83,97		10,69		5,34	
SD	4,29		0,96		0,52	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	5	4,90	0	0,00	1	0,98
	3	2,94	0	0,00	2	1,96
	6	5,88	1	0,98	2	1,96
	5	4,90	2	1,96	1	0,98
	5	4,90	2	1,96	0	0,00
	5	4,90	1	0,98	2	1,96
	7	6,86	2	1,96	0	0,00
	8	7,84	0	0,00	2	1,96
	6	5,88	1	0,98	1	0,98
	4	3,92	0	0,00	1	0,98
	2	1,96	1	0,98	0	0,00
	2	1,96	2	1,96	1	0,98
	5	4,90	2	1,96	1	0,98
	5	4,90	2	1,96	1	0,98
Summe	68		16		15	
Prozent	68,69		16,16		15,15	
SD	1,70		0,86		0,73	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 6						
Ergebnis	t-Test	Typ 1: 0,40	Typ 2: 0,07	Typ 3: 0,97		
(Mono- vs. Cokultur)						
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	3	4,62	1	1,54	1	1,54
	4	6,15	1	1,54	0	0,00
	3	4,62	2	3,08	1	1,54
	3	4,62	3	4,62	0	0,00
	3	4,62	0	0,00	0	0,00
	1	1,54	2	3,08	1	1,54
	2	3,08	2	3,08	0	0,00
	3	4,62	2	3,08	0	0,00
	3	4,62	1	1,54	0	0,00
	2	3,08	1	1,54	0	0,00
	6	9,23	2	3,08	0	0,00
	3	4,62	1	1,54	0	0,00
	4	6,15	1	1,54	0	0,00
	2	3,08	1	1,54	0	0,00
Summe	42		20		3	
Prozent	64,62		30,77		4,62	
SD	1,18		0,76		0,43	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	2	2,99	1	1,49	0	0,00
	3	4,48	1	1,49	0	0,00
	4	5,97	0	0,00	1	1,49
	1	1,49	1	1,49	1	1,49
	3	4,48	0	0,00	0	0,00
	3	4,48	1	1,49	0	0,00
	5	7,46	2	2,99	0	0,00
	4	5,97	2	2,99	0	0,00
	3	4,48	0	0,00	0	0,00
	10	14,93	1	1,49	0	0,00
	4	5,97	2	2,99	0	0,00
	4	5,97	0	0,00	0	0,00
	2	2,99	1	1,49	1	1,49
	3	4,48	1	1,49	0	0,00
Summe	51		13		3	
Prozent	76,12		19,40		4,48	
SD	2,10		0,73		0,43	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 7						
Ergebnis	t-Test	Typ 1: 0,10	Typ 2: 0,04	Typ 3: 0,93		
(Mono- vs. Cokultur)						
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ3%
	2	2,13	7	7,45	2	2,13
	4	4,26	1	1,06	0	0,00
	0	0,00	1	1,06	1	1,06
	1	1,06	3	3,19	0	0,00
	4	4,26	3	3,19	2	2,13
	3	3,19	2	2,13	2	2,13
	3	3,19	2	2,13	1	1,06
	1	1,06	3	3,19	0	0,00
	5	5,32	3	3,19	2	2,13
	4	4,26	0	0,00	1	1,06
	4	4,26	3	3,19	0	0,00
	5	5,32	2	2,13	1	1,06
	4	4,26	2	2,13	0	0,00
	2	2,13	7	7,45	1	1,06
Summe	42		39		13	
Prozent	44,68		41,49		13,83	
SD	1,57		2,01		0,83	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ3%
	7	4,73	3	2,03	3	2,03
	4	2,70	2	1,35	2	1,35
	3	2,03	2	1,35	1	0,68
	3	2,03	2	1,35	1	0,68
	8	5,41	2	1,35	1	0,68
	7	4,73	4	2,70	3	2,03
	4	2,70	0	0,00	1	0,68
	2	1,35	6	4,05	1	0,68
	11	7,43	2	1,35	1	0,68
	8	5,41	4	2,70	3	2,03
	13	8,78	2	1,35	1	0,68
	13	8,78	1	0,68	1	0,68
	9	6,08	1	0,68	0	0,00
	3	2,03	1	0,68	2	1,35
Summe	95		32		21	
Prozent	64,19		21,62		14,19	
SD	3,77		1,54		0,94	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 8						
Ergebnis	t-Test	Typ 1: 0,52	Typ 2: 0,54	Typ 3: 0,35		
(Mono- vs. Cokultur)						
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	4	6,25	1	1,56	0	0,00
	4	6,25	1	1,56	1	1,56
	2	3,13	0	0,00	2	3,13
	5	7,81	1	1,56	0	0,00
	3	4,69	1	1,56	0	0,00
	4	6,25	0	0,00	1	1,56
	0	0,00	1	1,56	1	1,56
	3	4,69	1	1,56	1	1,56
	2	3,13	1	1,56	1	1,56
	1	1,56	0	0,00	2	3,13
	2	3,13	0	0,00	1	1,56
	3	4,69	1	1,56	0	0,00
	3	4,69	1	1,56	0	0,00
	7	10,94	2	3,13	0	0,00
Summe	43		11		10	
Prozent	67,19		17,19		15,63	
SD	1,73		0,58		0,73	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	4	6,45	1	1,61	1	1,61
	3	4,84	2	3,23	0	0,00
	4	6,45	0	0,00	1	1,61
	3	4,84	0	0,00	1	1,61
	4	6,45	2	3,23	1	1,61
	5	8,06	0	0,00	1	1,61
	4	6,45	0	0,00	2	3,23
	3	4,84	0	0,00	1	1,61
	0	0,00	1	1,61	1	1,61
	0	0,00	1	1,61	1	1,61
	1	1,61	1	1,61	0	0,00
	2	3,23	2	3,23	0	0,00
	1	1,61	2	3,23	2	3,23
	2	3,23	1	1,61	1	1,61
Summe	36		13		13	
Prozent	58,06		20,97		20,97	
SD	1,60		0,83		0,62	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 9						
Ergebnis	t-Test	Typ 1: 0,95	Typ 2: 0,82	Typ 3: 0,88		
(Mono- vs. Cokultur)						
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	1	1,56	0	0,00	1	1,56
	2	3,13	0	0,00	1	1,56
	1	1,56	0	0,00	1	1,56
	1	1,56	1	1,56	1	1,56
	3	4,69	2	3,13	0	0,00
	3	4,69	1	1,56	2	3,13
	2	3,13	1	1,56	1	1,56
	1	1,56	1	1,56	0	0,00
	3	4,69	0	0,00	1	1,56
	2	3,13	1	1,56	1	1,56
	2	3,13	0	0,00	1	1,56
	0	0,00	2	3,13	0	0,00
	3	4,69	1	1,56	1	1,56
	4	6,25	0	0,00	2	3,13
	6	9,38	0	0,00	0	0,00
	3	4,69	2	3,13	2	3,13
Summe	37		12		15	
Prozent	57,81		18,75		23,44	
SD	1,45		0,77		0,68	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	4	5,71	0	0,00	2	2,86
	1	1,43	2	2,86	1	1,43
	2	2,86	0	0,00	1	1,43
	1	1,43	0	0,00	1	1,43
	4	5,71	0	0,00	2	2,86
	1	1,43	1	1,43	1	1,43
	5	7,14	2	2,86	0	0,00
	0	0,00	1	1,43	2	2,86
	3	4,29	1	1,43	1	1,43
	5	7,14	0	0,00	1	1,43
	2	2,86	1	1,43	1	1,43
	2	2,86	2	2,86	0	0,00
	3	4,29	0	0,00	1	1,43
	3	4,29	0	0,00	0	0,00
	2	2,86	0	0,00	2	2,86
	3	4,29	2	2,86	1	1,43
Summe	41		12		17	
Prozent	58,57		17,14		24,29	
SD	1,46		0,86		0,68	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 10						
Ergebnis	t-Test	Typ 1: 0,82	Typ 2: 0,33	Typ 3: 0,43		
(Mono- vs. Cokultur)						
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	1	1,67	0	0,00	1	1,67
	0	0,00	2	3,33	0	0,00
	3	5,00	0	0,00	1	1,67
	1	1,67	2	3,33	0	0,00
	3	5,00	2	3,33	0	0,00
	3	5,00	0	0,00	1	1,67
	1	1,67	0	0,00	1	1,67
	6	10,00	1	1,67	0	0,00
	1	1,67	0	0,00	1	1,67
	3	5,00	3	5,00	1	1,67
	2	3,33	1	1,67	1	1,67
	1	1,67	1	1,67	0	0,00
	3	5,00	1	1,67	1	1,67
	2	3,33	0	0,00	1	1,67
	5	8,33	0	0,00	1	1,67
	1	1,67	0	0,00	1	1,67
Summe	36		13		11	
Prozent	60,00		21,67		18,33	
SD	1,61		0,98		0,48	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	2	3,13	0	0,00	1	1,56
	6	9,38	1	1,56	0	0,00
	2	3,13	1	1,56	1	1,56
	2	3,13	0	0,00	1	1,56
	4	6,25	0	0,00	1	1,56
	1	1,56	2	3,13	0	0,00
	4	6,25	0	0,00	1	1,56
	1	1,56	0	0,00	1	1,56
	1	1,56	1	1,56	1	1,56
	9	14,06	0	0,00	2	3,13
	1	1,56	1	1,56	1	1,56
	2	3,13	1	1,56	0	0,00
	1	1,56	1	1,56	1	1,56
	1	1,56	0	0,00	1	1,56
	3	4,69	1	1,56	1	1,56
	1	1,56	0	0,00	1	1,56
Summe	41		9		14	
Prozent	64,06		14,06		21,88	
SD	2,25		0,63		0,50	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 11						
Ergebnis	t-Test	Typ 1: 0,71	Typ 2: 0,64	Typ 3: 0,29		
(Mono- vs. Cokultur)						
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	1	1,54	0	0,00	1	1,54
	1	1,54	1	1,54	0	0,00
	7	10,77	1	1,54	0	0,00
	5	7,69	1	1,54	0	0,00
	1	1,54	1	1,54	0	0,00
	1	1,54	1	1,54	0	0,00
	1	1,54	1	1,54	0	0,00
	7	10,77	0	0,00	0	0,00
	5	7,69	1	1,54	0	0,00
	3	4,62	0	0,00	1	1,54
	4	6,15	1	1,54	0	0,00
	3	4,62	0	0,00	1	1,54
	2	3,08	1	1,54	0	0,00
	1	1,54	0	0,00	1	1,54
	1	1,54	0	0,00	1	1,54
	5	7,69	1	1,54	0	0,00
Summe	48		10		5	
Prozent	76,19		15,87		7,94	
SD	2,22		0,50		0,48	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	0	0,00	0	0,00	1	1,59
	8	12,70	1	1,59	0	0,00
	3	4,76	2	3,17	0	0,00
	2	3,17	2	3,17	0	0,00
	3	4,76	1	1,59	0	0,00
	7	11,11	0	0,00	0	0,00
	4	6,35	0	0,00	1	1,59
	1	1,59	1	1,59	0	0,00
	5	7,94	0	0,00	1	1,59
	2	3,17	1	1,59	0	0,00
	5	7,94	1	1,59	1	1,59
	2	3,17	0	0,00	1	1,59
	2	3,17	0	0,00	1	1,59
	1	1,59	1	1,59	1	1,59
Summe	45		10		7	
Prozent	72,58		16,13		11,29	
SD	2,33		0,73		0,52	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 12						
Ergebnis	t-Test	Typ 1: 0,72	Typ 2: 0,12	Typ 3: 0,43		
(Mono- vs. Cokultur)						
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	1	1,59	1	1,59	0	0,00
	3	4,76	1	1,59	1	1,59
	3	4,76	0	0,00	2	3,17
	2	3,17	2	3,17	1	1,59
	5	7,94	2	3,17	0	0,00
	5	7,94	0	0,00	1	1,59
	0	0,00	1	1,59	0	0,00
	1	1,59	0	0,00	1	1,59
	1	1,59	2	3,17	0	0,00
	2	3,17	0	0,00	1	1,59
	5	7,94	0	0,00	0	0,00
	3	4,76	1	1,59	0	0,00
	3	4,76	2	3,17	1	1,59
	2	3,17	1	1,59	1	1,59
	5	7,94	0	0,00	0	0,00
Summe	41		13		9	
Prozent	65,08		20,63		14,29	
SD	1,67		0,83		0,63	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	6	6,38	1	1,06	2	2,13
	6	6,38	0	0,00	4	4,26
	2	2,13	2	2,13	2	2,13
	1	1,06	2	2,13	1	1,06
	2	2,13	0	0,00	1	1,06
	4	4,26	0	0,00	1	1,06
	2	2,13	2	2,13	0	0,00
	6	6,38	1	1,06	0	0,00
	4	4,26	0	0,00	2	2,13
	7	7,45	0	0,00	2	2,13
	1	1,06	1	1,06	0	0,00
	4	4,26	0	0,00	0	0,00
	7	7,45	1	1,06	1	1,06
	8	8,51	0	0,00	2	2,13
	6	6,38	0	0,00	0	0,00
Summe	66		10		18	
Prozent	86,84		13,16		23,68	
SD	2,35		0,82		1,15	

Fortsetzung Tabelle 3. Auswertungen Mono- und Cokultur

Auswertung Probe 13						
Ergebnis	t-Test	Typ 1: 0,46	Typ 2: 0,85	Typ 3: 0,62		
(Mono- vs. Cokultur)						
Zählung						
Monokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	3	4,76	0	0,00	1	1,59
	5	7,94	1	1,59	0	0,00
	1	1,59	2	3,17	1	1,59
	2	3,17	2	3,17	0	0,00
	2	3,17	1	1,59	2	3,17
	1	1,59	1	1,59	1	1,59
	1	1,59	0	0,00	2	3,17
	5	7,94	1	1,59	0	0,00
	4	6,35	0	0,00	1	1,59
	3	4,76	0	0,00	1	1,59
	2	3,17	0	0,00	1	1,59
	3	4,76	3	4,76	1	1,59
	2	3,17	0	0,00	1	1,59
	4	6,35	1	1,59	1	1,59
Summe	38		12		13	
Prozent	60,32		19,05		20,63	
SD	1,38		0,95		0,62	
Cokultur	TYP 1	TYP1%	TYP 2	TYP2%	Typ 3	Typ 3%
	5	6,76	1	1,35	1	1,35
	2	2,70	1	1,35	1	1,35
	4	5,41	0	0,00	1	1,35
	1	1,35	2	2,70	1	1,35
	1	1,35	3	4,05	1	1,35
	3	4,05	0	0,00	2	2,70
	6	8,11	0	0,00	2	2,70
	2	2,70	1	1,35	1	1,35
	2	2,70	0	0,00	2	2,70
	6	8,11	0	0,00	1	1,35
	2	2,70	1	1,35	2	2,70
	3	4,05	2	2,70	1	1,35
	4	5,41	2	2,70	0	0,00
	3	4,05	0	0,00	1	1,35
Summe	44		13		17	
Prozent	59,46		17,57		22,97	
SD	1,66		1,00		0,58	

7.5 qRT-PCR-Daten

Tabelle 4. qRT-PCR Daten.

	LINGO1	MAP6	ZMYND 11	SQLE	PIP	MUCL1	ELF5	28sRNA
cT-Mittelwert nicht-revertiert	29,12	30,98	25,86	28,02	25,17	27,37	32,38	13,29
cT-Mittelwert revertiert	31,84	34,29	27,08	29,27	21,99	22,89	29,47	13,39
cT-Mittelwert nicht-revertiert (normalisiert)	2,20	2,34	1,95	2,11	1,91	2,07	2,21	
cT-Mittelwert revertiert (normalisiert)	2,38	2,57	2,03	2,20	1,64	1,72	2,44	
PCR Fold Change (Revertiert vs. nicht-revertiert)	-5,92	-8,9	-2,09	-2,14	10,07	24,78	8,35	
Genchip Fold Change (Revertiert vs. nicht-revertiert)	-3,55	-5,62	-3,76	-3,45	4,77	7,71	3,35	

Danksagung

Allen voran danke ich Frau Dr. Inke Lühr und Frau Dr. Maret Bauer.

Frau Dr. Inke Lühr danke ich für die vielen Stunden, die Sie mir mit Rat und Tat in fachlichen sowie privaten Krisen zur Seite stand, für ihre Gesellschaft an den langen Wochenenden im Labor, ihren fortwährenden Enthusiasmus und ihre norddeutsche Ruhe.

Frau Dr. Maret Bauer danke ich sehr für ihre unermüdliche und stetige Unterstützung bei dieser Arbeit. Wenige Doktoranden werden so gut und intensiv betreut. Eine bessere Arbeitsgruppe kann man sich nicht wünschen. That's research!

Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. Jonat danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Doktorarbeit an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Arnold danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine große Hilfsbereitschaft. Seinem onkologischen Labor, vor allem Frank Rösel, Regina Grunewald und Sigrid Hamann, danke ich für die schöne Zeit und die Aufnahme in dieses familiäre Team.

Ich danke meinen Eltern für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich, ihre Unterstützung und ihre vielen Ratschläge. Besonderer Dank gilt hierbei meiner Mutter für ihre Liebe und Ihre mütterlichen Führung. Darüber hinaus danke ich meiner Großmutter dafür, dass sie mir als so starke, kluge und widerstandsfähige Frau immer ein großes Vorbild ist.

Zuletzt danke ich Philipp dafür, dass er immer ein offenes Ohr hatte, mir liebevoll beiseite stand und mir immer nach Kräften geholfen hat.

Lebenslauf

Anna-Maria Römer
Schwerinstr. 21
40477 Düsseldorf

Zur Person:

- Geboren am 28.03.1988 in Detmold

Ausbildung:

12/2012	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Note: 2,0
04-07/2012	Chirurgische Klinik, Städtisches Krankenhaus Kiel Drittes Tertial des praktischen Jahres
12/2011-04/2012	Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Kantonspital St. Gallen Zweites Tertial des praktischen Jahres
08-12/2011	1. Med. Klinik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel Erstes Tertial des praktischen Jahres
08/2008	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Note: 2,0
06/2006	Allgemeine Hochschulreife Leopoldinum Detmold, Note: 1,5

Publikationen:

3/2013	Römer, A.M., Lühr, I., et al. (2013) Normal mammary fibroblasts induce reversion of the malignant phenotype in human primary breast cancer. <u>Anticancer Res.</u> 2013 Apr;33(4):1525-36.
10/2012	Vortrag auf dem DGGG, München
05/2012	Posterpräsentation auf dem NGGG, Kiel
10/2010	Posterpräsentation auf dem DGGG, München